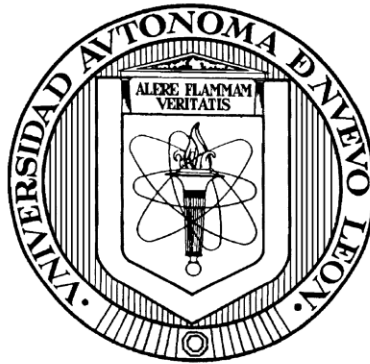


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POSGRADO CONJUNTO

AGRONOMÍA - VETERINARIA



**EVALUACIÓN DE ALTERNATIVAS FITOTERAPÉUTICAS Y ACARICIDAS
SINTÉTICOS SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acarí: Ixodidae)**

POR

ROMARIO GARCÍA PONCE

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL

ESCOBEDO, N.L.

JUNIO DE 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POSGRADO CONJUNTO

AGRONOMÍA - VETERINARIA



**EVALUACIÓN DE ALTERNATIVAS FITOTERAPÉUTICAS Y ACARICIDAS
SINTÉTICOS SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acarí: Ixodidae)**

COMITÉ DE TESIS

Dr. José Pablo Villarreal Villarreal

Presidente

Dr. Julio César Cruz Valdez

Secretario

Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez

Vocal

**EVALUACIÓN DE ALTERNATIVAS FITOTERAPÉUTICAS Y ACARICIDAS
SINTÉTICOS SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)**

DIRECCIÓN DE TESIS



Dr. José Pablo Villarreal Villarreal

Director



Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez

Director Externo



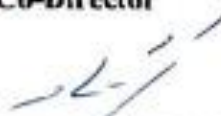
Dr. Julio César Cruz Valdez

Co-Director



Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño

Co-Director



Dr. Gustavo Ponce García

Co-Director Externo

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento, a las siguientes personas e instituciones que, con su apoyo emocional, intelectual y económico, han hecho posible la realización de esta tesis, cumpliendo así uno de los objetivos más importantes para mí.

Al CONACYT por el apoyo financiero otorgado, a PRODEP y a PAICYT por el apoyo financiero del proyecto, así mismo a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a la Facultad de Ciencias Biológicas, que me permitieron llevar a cabo los experimentos de este proyecto.

Agradecer principalmente al Dr. José Pablo Villarreal Villarreal, por ser mi director de tesis y apoyarme en todo momento en la realización de este proyecto y guiarme con su inteligencia y experiencia.

Al Dr. Sergio A. Galindo Rodríguez por aceptar ser parte de este proyecto de tesis y guiarme con sus conocimientos, además de apoyarme en la obtención y caracterización de los extractos.

Al Dr. Julio César Cruz Valdez por aceptar ser parte de este proyecto de tesis y guiarme con sus conocimientos, además de apoyarme en todo lo relacionado a la caracterización bioquímica de las poblaciones.

Al Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño por ser mi amigo y asesor de tesis, además de apoyarme con su inteligencia y experiencia sobre las garrapatas en la realización de esta tesis.

Al Dr. Gustavo Ponce García mi “tío”, por aceptar ser mi asesor de tesis y guiarme con sus conocimientos sobre las garrapatas y apoyarme en la realización de esta tesis.

A mis compañeros de la maestría, que me apoyaron durante el camino y hasta el fin de la maestría. Raúl Aguirre, Kassandra Gaytán, Cecilia Hernández, Emmanuel Hernández, Andrea Cavazos, Emiliano Zapara, Rebeca Valdez, Guadalupe Bejarano y Samary Sepúlveda.

A todos los integrantes del Laboratorio de Nanotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, especialmente al Dr. Andrés Piña, por su apoyo cuando comencé a trabajar ahí.

A mis alumnos del equipo de Taekwondo de la Facultad De Ciencias Biológicas, con quienes me desestresaba, después de un día agotador.

Finalmente agradezco a todas las personas que tuvieron que ver directa e indirectamente en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a todas las personas que hicieron posible la realización de este posgrado, en especial a mis padres Martin García Herrera y Mirna L. Ponce Hernández, que siempre me apoyaron y lograron verme hacer esto realidad.

A mi tío Noel García, Liliana Pérez e hijos y a mi abuelita Nicandra Herrera Torres, que siempre han estado apoyándome y dándome ánimos a lo largo de la licenciatura y el posgrado.

Principalmente, dedico este trabajo a Ana Cecilia Rivas Montemayor, una persona muy importante en esta etapa de mi vida, quien me apoyó, orientó y estuvo conmigo en cada momento.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	ANTECEDENTES.....	3
2.1.	Generalidades de las garrapatas.....	3
2.2.	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	3
2.2.1.	Taxonomía.....	3
2.2.2.	Morfología de <i>R. (B.) microplus</i>	4
2.2.3.	Ciclo de vida.....	5
2.2.4.	Distribución geográfica en México.....	6
2.2.5.	Efectos directos e indirectos.....	7
2.3.	Control químico.....	8
2.3.1.	Mezclas de acaricidas y sinergistas.....	9
2.4.	Resistencia de <i>R. (B.) microplus</i> a los ixodicidas.....	10
2.4.1.	Mecanismos de resistencia de <i>R. (B.) microplus</i>	11
2.4.1.1.	Resistencia metabólica.....	11
2.4.1.2.	Resistencia por mutaciones en garrapatas.....	12
2.5.	Diagnóstico de la resistencia por bioensayos.....	13
2.5.1.	Manejo de las teleoginas para la producción de larvas.....	14
2.5.2.	Prueba de Paquete de Larvas.....	14
2.5.3.	Prueba de Inmersión de Larvas.....	14
2.5.4.	Prueba de Inmersión de Adultas.....	15
2.6.	Situación de la resistencia en México.....	15
2.7.	Alternativas fitoterapéuticas.....	16
2.7.1.	Género <i>Cordia</i>	17
2.7.1.1.	<i>Cordia boissieri</i>	17
2.7.2.	Género <i>Artemisia</i>	18
2.7.2.1.	<i>Artemisia ludoviciana</i>	18
2.7.3.	<i>Litchi chinensis</i>	19
3.	JUSTIFICACIÓN.....	21
4.	HIPÓTESIS.....	22
5.	OBJETIVO GENERAL.....	22

6.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
	7.1. Colecta de plantas.....	23
	7.2. Obtención de extractos.....	23
	7.3. Análisis de cromatografía en capa fina.....	23
	7.4. Caracterización fitoquímica.....	24
	7.5. Colecta de garrapatas.....	24
	7.6. Identificación de garrapatas.....	25
	7.7. Establecimiento de la población en el laboratorio.....	25
	7.8. Evaluación de la actividad enzimática de las poblaciones.....	26
	7.8.1. Obtención de extractos enzimáticos.....	26
	7.8.2. Actividad de la Acetilcolinesterasa (AChE).....	26
	7.8.3. Actividad de la Carboxilesterasa (CaE).....	26
	7.8.4. Actividad de la Fosfatasa Alcalina (ALP).....	27
	7.8.5. Actividad de la Glutación-S-Transferasa (GST).....	27
	7.8.6. Determinación de la concentración de proteína.....	27
	7.9. Bioensayos.....	28
	7.9.1. Obtención de los Ixodíctidos.....	28
	7.9.2. Prueba de Paquete de Larvas.....	28
	7.9.3. Prueba de Inmersión de Larvas.....	29
	7.10. Análisis Estadístico.....	30
8.	RESULTADOS.....	31
	8.1. Rendimiento de los extractos.....	31
	8.2. Identificación parcial de los compuestos en los extractos.....	31
	8.3. Caracterización bioquímica de las poblaciones.....	32
	8.3 Bioensayos.....	32
9.	DISCUSIÓN.....	34
10.	CONCLUSIONES.....	41
11.	LITERATURA CONSULTADA.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas fitoquímicas efectuadas en la caracterización de los extractos.....	24
Tabla 2. Rendimientos obtenidos a partir de 460g de material biológico para cada planta.....	31
Tabla 3. Caracterización fitoquímica de los extractos metanólicos.....	31
Tabla 4. Mortalidad de los acaricidas sintéticos y extractos de las plantas en las dos poblaciones.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología general de <i>R. (B.) microplus</i>	4
Figura 2. Ciclo biológico de <i>R. (B.) microplus</i>	5
Figura 3. Distribución geográfica de <i>R. (B.) microplus</i> en México.....	6
Figura 4. Situación de la campaña, para el control de <i>R. (B.) microplus</i> en México.....	7
Figura 5. Distribución de cepas de <i>R. (B.) microplus</i> en México.....	16
Figura 6. Árbol de <i>C. boissieri</i>	18
Figura 7. <i>L. chinensis</i> . A=Fruto con cascara, B=fruto sin cascara y C=Semilla.....	20
Figura 8. Localización del área de estudio (Nuevo León)	25
Figura 9. Localización del área de estudio (Veracruz).....	25
Figura 10. Actividad enzimática de la AChE, GST, CaE, y ALP en poblaciones de larvas de <i>R. (B.) microplus</i>	35

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AChE:	Acetilcolinesterasa
ALP:	Fosfatasa Alcalina
ANOVA:	Análisis de Varianza
AO:	Aceite de Oliva
BSA:	Albumina de Suero Bovino
CaE:	Carboxilesterasa
CDNB:	1-cloro-2,4-Dinitrobenzeno
CENAPA:	Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal
CFSPH:	Center for Food Security & Public Health
DD:	Dosis Discriminante
DTNB:	Ácido 5,5'-Dithiobis 2-Nitrobenzoico
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GS-DNB:	Conjugado de L-glutación con 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
GST:	Glutación-S-transferasa
M:	Molar
NL:	Nuevo León
NOM:	Norma Oficial Mexicana
PBO:	Butóxido de Piperonilo
PIL:	Prueba de Inmersión de Larvas
PPL:	Prueba de Paquete de Larvas
SENASICA:	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
Tc:	Tricloroetileno
UV:	Ultravioleta.
Ver:	Veracruz

RESUMEN

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888), presenta pérdidas anuales de 573.61 millones de dólares en México, con el 69.40% del territorio nacional en fase de control y erradicación. Debido a la resistencia a los acaricidas comerciales, alternativas terapéuticas se han venido estudiando, como lo son las plantas. En este trabajo, dos poblaciones de larvas de *R. (B.) microplus*, una del estado de Nuevo León (N.L.) y otra de Veracruz (Ver.), se caracterizaron bioquímicamente a partir de la actividad enzimática de la Acetilcolinesterasa (AChE), Carboxilesterasa (CaE), Glutación-S-Transferasa (GST) y Fosfatasa Alcalina (ALP). Además, se evaluó la actividad acaricida *in vitro* de tres extractos metanólicos, uno obtenido a partir de la semilla de *Litchi chinensis* y dos a partir de hojas de *Artemisia ludoviciana* y *Cordia boissieri*, así como tres ixodicidas de uso común. Tres concentraciones diferentes de los extractos (50, 100 y 150 mg/mL) y un piretroide, un organofosforado y una asociación de piretroide-organofosforado, fueron probados. Los datos, se analizaron para evaluar la suposición de distribución normal y la homogeneidad de la varianza. Para la evaluación de la actividad enzimática, se utilizó la prueba t de Student para los datos normales y U de Man-Whitney para los que no. En los bioensayos, se utilizó un ANOVA y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. Las cuatro enzimas analizadas en las dos poblaciones presentaron diferencia significativa, siendo la población de Veracruz, la que presentó mayor actividad enzimática. El extracto de *L. chinensis*, mostró alta eficacia acaricida (99.44% en N.L y 99.73% en Ver.). En el extracto de *A. ludoviciana*, la eficacia fue del 89.34% y 89.21% y en el de *C. boissieri*, fue del 33.04% y 10.33% respectivamente, presentando mayor eficacia que el piretroide en la población de Ver. El organofosforado, alcanzó 100% de mortalidad en ambas poblaciones, la asociación presentó 100% en N.L y 97.50% en Ver. Se concluye, que el extracto de semilla de *L. chinensis*, mostró potencial para ser utilizado como fuente alternativa en el control, sin embargo, estudios previos de caracterización, toxicidad y formulación son necesarios. Por otra parte, se destaca la presencia de actividad acaricida en los otros extractos. Respecto a los acaricidas sintéticos, cabe mencionar la baja mortalidad del piretroide y la situación de la múltiple resistencia a acaricidas en la población de Ver.

Palabras clave: Extractos, Acaricidas, Garrapata.

ABSTRACT

In Mexico, the tick species *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888), causes annual economic losses estimated in US\$ 573.61 million, with 69.40% of the national territory in control and eradication phase. Due to commercial acaricide resistance, therapeutic alternatives had been studied, such as plants. In this work, two *R. (B.) microplus* larvae populations, one from the state of Nuevo León (N.L.) and the other one from the state of Veracruz (Ver.), were biochemically characterized by the enzyme kinetics of the Acetylcholinesterase (AChE), Carboxylesterase (CaE), Glutathione S-transferase (GST) and Alkaline phosphatase (ALP). The *in vitro* acaricide activity of three methanolic extracts was evaluated. One of the extracts used, was obtained from seeds of *Litchi chinensis* and the other two from leaves of *Artemisia ludoviciana* and *Cordia boissieri*. Three commonly used commercial acaricides were also evaluated. Three different concentrations of the extracts (50, 100 y 150 mg/mL) and a pyrethroid, an organophosphate and an organophosphate-pyrethroid association were tested. Data was analyzed to evaluate the supposition of the normal distribution and the homogeneity of variance. In the biochemical characterization, Student's t-test was used for the normal distribution and the Mann-Whitney U test for the non-normal distribution. For the bioassays, an ANOVA and a Tukey's test were used. The four analyzed enzymes in the two populations, showed significant difference, being the population of Ver., the one that presented higher enzymatic activity. The extract of *L. chinensis*, showed high acaricide efficacy (99.44% in N.L and 99.73% in Ver.). In the extract of *A. ludoviciana*, the efficacy was of 89.34% and 89.21% and in the extract of *C. boissieri* was of 33.04% and 10.33% respectively, showing higher efficacy than the pyrethroid in the population of Ver. It can be concluded that the extract of the seed of *L. chinensis*, showed potential to be used as an alternative source in the control, however, prior studies of characterization, toxicity and formulation are necessary. On the other hand, the presence of acaricide activity in the other extracts stands out. Regarding the synthetic acaricides, it is worth mentioning the low mortality of the pyrethroid and the multiple acaricide resistance situation in the population of Ver.

Key words: Extracts, Acaricides, Tick.

1. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos, su importancia ha sido reconocida por su impacto en la salud humana y animal, debido al daño que causan al alimentarse y por transmitir diversos organismos patógenos (Guglielmone et al., 2004). La especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, es vector de la piroplasmosis y anaplasmosis, enfermedades de extrema importancia en la salud de los bovinos, causando un gran impacto económico en el sector pecuario (Jongejan & Uilenberg, 2004; Rodríguez-Vivas et al., 2006).

R. (B.) microplus, se presenta entre el paralelo 32° norte y 32° sur (Estrada et al., 2006), abarcando zonas tropicales, templadas y áridas, con una distribución del 53% del territorio nacional, del cual, el 65.96% se encuentra en fase de control (SENASICA, 2016). En estas zonas de la república, se cuenta con áreas de alta humedad relativa en el suelo y temperatura elevada, lo que favorece la sobrevivencia de poblaciones de esta garrapata (Estrada et al., 2006), con hasta cuatro generaciones por año y con pérdidas anuales de hasta 573.61 millones de dólares en México (Rodríguez-Vivas et al. 2017).

En México, se sabe que, en la mayoría de los hatos de producción, el control de *R. (B.) microplus* es realizado exclusivamente con el uso de garrapaticidas sintéticos, sobre todo organofosforados, piretroides y amidinas, así como la implementación de técnicas para mejorar la eficacia de los acaricidas, como son; las mezclas y formulaciones con sinergistas (Rodríguez-Vivas et al., 2006; Renteria & Sevilla, 2015). El surgimiento de la resistencia de *R. (B.) microplus* hacia los ixodicidas, viene generando serios problemas en la producción de los bovinos, con una tendencia mundial. La principal causa del desarrollo de la resistencia a la mayoría de los garrapaticidas sintéticos, está asociada a la expresión de factores intrínsecos o biológicos relacionados con la garrapata, como son; las mutaciones génicas, debido a la producción de alelos dominantes resistentes dentro de las poblaciones, lo que resulta en la insensibilidad del sitio de acción de los ixodicidas y cambios enzimáticos en el metabolismo (Guerrero et al., 2001; Foil et al., 2004).

Dentro de los mecanismos de la resistencia metabólica, se encuentra; la producción de la acetilcolinesterasa (AChE) alterada, lo que provoca la inhibición de organofosforados (Temeyer et al., 2004). Otras enzimas que juegan un papel importante en la resistencia son; las carboxilesterasas (CaE), ya que se ha descrito, una desintoxicación metabólica

incrementada mediada por estas enzimas, indicando resistencia tanto para organofosforados y piretroides (Rosario-Cruz et al., 1997; Jamroz et al., 2000). Los factores biológicos relacionados a la garrapata se deben principalmente al factor operacional. Este fenómeno, se presenta debido a que la mayoría de los productores usa el producto químico como única herramienta para el control de este ectoparásito, resultando en resistencia por presión de selección, siendo que muchas veces, es utilizado de una manera errónea. Un claro ejemplo, es la utilización excesiva de ixodicidas, sin conocer la biología y ecología de la garrapata, otro punto importante a considerar es la falla o nula detección de la resistencia (Riddles et al., 1987; Denholm et al., 1992), siendo este último, uno de los mayores problemas en México. Existen estudios sobre la resistencia en varios estados de nuestro país, teniendo garrapatas multirresistentes a organofosforados con piretroides en el sureste y zonas costeras del Pacífico y del Golfo de México (Fragoso & Soberanes, 2001; Rodríguez-Vivas et al., 2005). En el noreste de México, específicamente en el estado de Nuevo León, se han encontrado poblaciones de larvas de garrapatas, con poca susceptibilidad a piretroides y con resistencia a organofosforados (Rentería & Sevilla, 2015).

Actualmente, se buscan obtener otras opciones terapéuticas para resolver este problema y disminuir el uso de los ixodicidas sintéticos. Dichas opciones, son los compuestos y productos de origen botánico. En este contexto, estudios demuestran que aceites y extractos vegetales, vienen ganando espacio como métodos de control para *R. (B.) microplus* (Castro et al., 2011; Campos et al., 2012).

El objetivo de este estudio, es caracterizar la respuesta enzimática de la acetilcolinesterasa, carboxylesterasa, fosfatasa alcalina y Glutación-S-transferasa de dos poblaciones de larvas de *R. (B.) microplus*, una proveniente del estado de Nuevo León y otra del estado de Veracruz, evaluar la mortalidad *in vitro* de las dos poblaciones frente a extractos metanólicos de hojas de las plantas *Artemisia ludoviciana* (estafiate) y *Cordia boissieri* (anacahuita) y de la semilla de *Litchi chinensis*, como también frente a un piretroide, un organofosforado y una asociación piretroide/organofosforado. Además, se caracterizarán parcialmente los componentes químicos de los extractos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de las garrapatas

Las diversas especies de garrapatas están ampliamente distribuidas en el mundo, de estas, el diez por ciento, se encuentra en el territorio nacional, lo que representa el 45% de las garrapatas de América Latina, con una gran variedad de climas, adecuados para su desarrollo (Núñez, 1987; Parra et al., 1999).

México, cuenta con 32 especies de garrapatas pertenecientes a cinco géneros de la familia Argasidae y 68 especies pertenecientes a cinco géneros de la familia Ixodidae, dando un total de 100 especies de garrapatas (Pérez et al, 2014). Las garrapatas de la familia Ixodidae, son las que tienen mayor importancia en la medicina veterinaria, puesto que se consideran vectores de patógenos, causantes de enfermedades infecciosas, generando importantes pérdidas económicas en la pecuaria (Oteo et al., 2001). La infestación por garrapatas en las regiones tropicales y subtropicales es uno de los principales problemas en la salud animal (Rodríguez-Vivas et al., 2004), siendo de mayor importancia, desde el punto de vista económico para la industria ganadera en México, la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Willadsen et al., 1999; Rodríguez-Vivas et al., 2004).

2.2. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

2.2.1. Taxonomía

Pertenece a la familia Ixodidae (garrapatas duras), anteriormente, se le conocía como; *Boophilus microplus*, pero recientemente *Boophilus*, se ha convertido en un subgénero del género *Rhipicephalus* (Center for Food Security & Public Health, 2007).

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Clase: Arachnida

Orden: Parasitiformes

Familia: Ixodidae

Género: *Rhipicephalus*

Subgénero: *Boophilus*

Especie: *microplus*

2.2.2 Morfología

R. (B.) microplus, se caracteriza por poseer un escudo dorsal no ornamentado, presentándose de manera completa en los machos y de manera incompleta en las hembras, ya que permite, que el abdomen crezca y se agrande lo suficiente para contener hasta dos centímetros cúbicos de sangre (Plata, 1931; Treviño, 2013). El macho, presenta dos pares de placas adanales largas y un apéndice caudal en el idiosoma. La fase adulta presenta cuatro pares de patas, sin embargo, las larvas presentan tres pares de patas (Aragón, 1961; Pereira et al., 2008).

La presencia de un rostro terminal con hipostoma grande y dentado, más largo que los palpos, es característica en todos los estados evolutivos. Los palpos, se insertan a los lados de las piezas bucales y se componen de cuatro segmentos, siendo el segundo de estas piezas, importantes para la diferenciación de los géneros. En la parte dorsal anterior, se localiza la cabeza o capítulo. Las placas espiraculares se localizan posterior a la coxa IV (Treviño, 2013).

Los ojos, se localizan en la región dorsal, ubicados cada uno, al lado del escudo, entre el segundo y tercer par de patas (Figura 1) (Plata, 1931; Treviño, 2013). Presenta un dimorfismo sexual muy considerado, ya que la hembra, es de un tamaño mayor considerable en relación con el macho. Un órgano adhesivo (ventosa), llamada caruncular, ambulacro o pulvillum, le permite caminar sobre el animal y al mismo tiempo, sostenerse sobre el mismo. Cuenta con un par de garras, que le permite afianzarse mejor a cualquier superficie (Treviño, 2013).

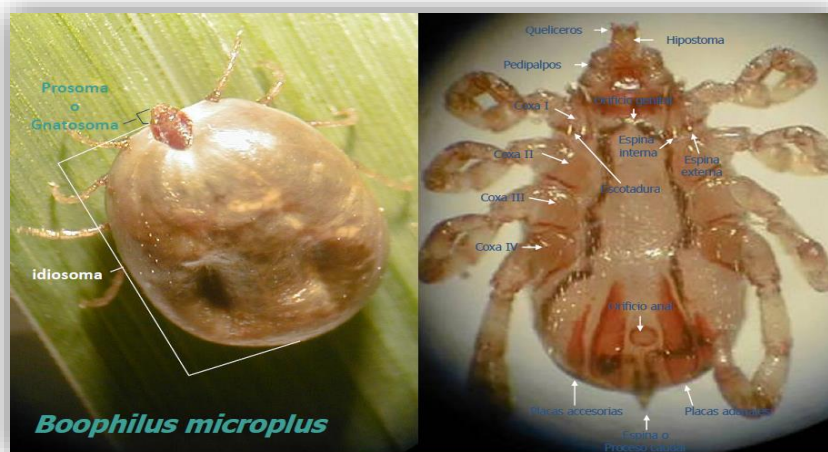


Figura 1. Morfología general de *R. (B.) microplus*. Se muestra la vista dorsal de una hembra y la vista ventral de un macho (SENASICA, 2018).

2.2.3 Ciclo de vida

Presenta un ciclo monoxénico de tres estadios (larva, ninfa y adulto), en dos fases de vida (Figura 2):

a) Fase de vida libre: Inicia cuando la hembra adulta ingurgitada (teleogina), se desprende del bovino, buscando un lugar oscuro y húmedo para ovopositar. La teleogina, ovoposita alrededor de 2,800-3,000 huevos. Una vez incubados, eclosionan las larvas, que posteriormente migran a la vegetación en busca de un hospedero. Esta fase, puede durar de 35-90 días dependiendo de las condiciones abióticas (Rodríguez-Vivas et al., 2005).

b) Fase de vida parásita: Inicia cuando la larva se sube a un hospedero y se alimenta de suero, las zonas anatómicas más comunes de infestación son; el pabellón auricular, la región de la ubre y la tabla del cuello. Durante esta fase, la larva muda para transformarse a ninfa aproximadamente en el día 7 (Seifert et al., 1968), la cual comienza a ingerir sangre. Esta a su vez, muda a adulto, donde se diferencia el sexo (macho y hembra adulta). La cópula, se realiza aproximadamente en el día 17. El desprendimiento de la hembra del bovino ocurre, ya una vez que esta queda repleta de sangre (ingesta de hasta 3 ml). El tiempo total que transcurre en esta fase es de 19 a 21 días (Rodríguez-Vivas et al., 2005; Horn, 1983; Furlong, 1993; Gonzales, 1974).

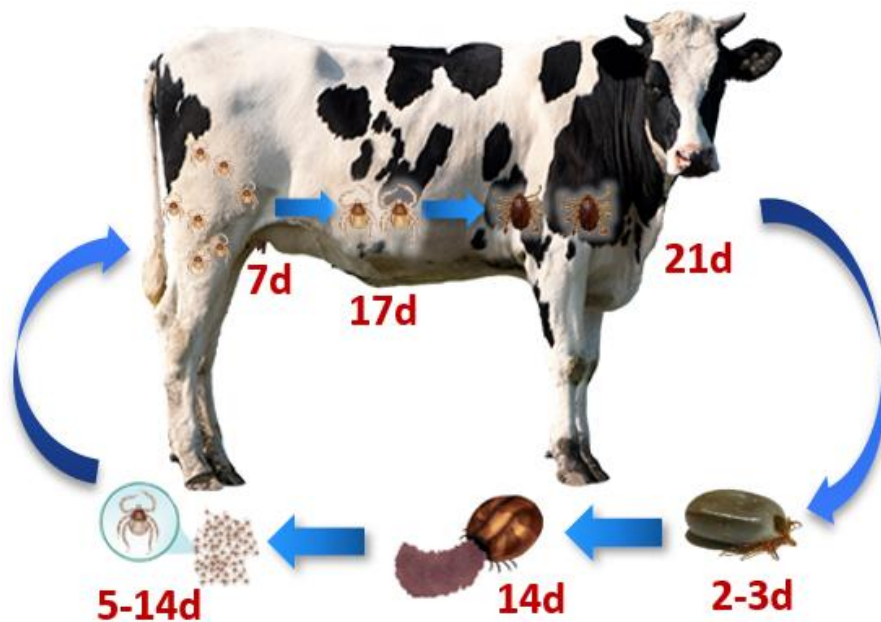


Figura 2. Ciclo biológico de *R. (B.) microplus* (Gonzales, 1974; Rosario-Cruz et al., 2009).

2.2.4. Distribución geográfica en México

Se presenta con una distribución entre el paralelo 32° norte al paralelo 32° sur (Estrada et al., 2006). En México, esta especie de garrapata se presenta de manera muy extensa, abarcando el 53% (1,043,772 km²) del territorio nacional, distribuyéndose en zonas tropicales, templadas y semiáridas (SENASICA, 2015). Estas zonas, cuentan con los factores de temperatura, humedad relativa y vegetación ideales que le brindan las características de supervivencia, siendo estos, factores determinantes para la distribución geográfica de esta garrapata en nuestro país (Figura 3). Algunos factores que también se ven involucrados en esta distribución son; la altitud, presencia y abundancia de hospederos y las prácticas de control, en las que el hombre, es participe sobre las poblaciones (Quiroz, 2005).

Según el estatus de sanidad que presentó la SENASICA (2016), se reconoce que los estados de; Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California y Chihuahua (con excepción de los municipios de Morelos y Guadalupe y Calvo) y el Norte de Baja California Sur, se encuentran libres del ectoparásito. En fase de erradicación, se encuentran; los Municipios de Los Cabos y la parte sur de La Paz, en Baja California Sur, los municipios de Ahome, El Fuerte y Choix, en el norte de Sinaloa, en su margen derecha del río El Fuerte; los municipios de la zona desierto del estado de Coahuila siendo estos; Cuatrociénegas, Ocampo y Sierra Mojada. En el resto del país, se comparten regiones en fase de control, ubicándose en estas los estados de Nuevo León y Veracruz, además, como zonas libres naturales (Figura 4).



Figura 3: Distribución geográfica de *R. (B.) microplus* en México (SENASICA, 2015).

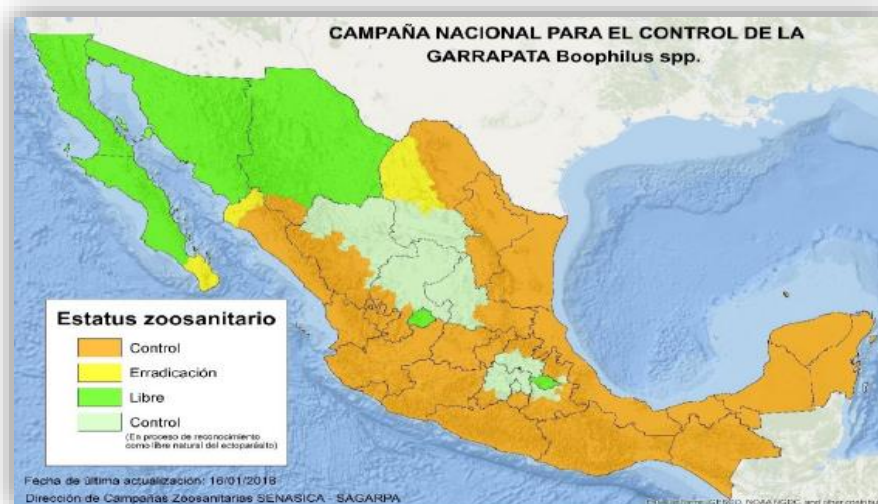


Figura 4: Situación de la campaña, para el control de *R. (B.) microplus* en México (SENASICA, 2016).

2.2.5. Efectos directos e indirectos

La importancia de *R. (B.) microplus* radica en la ganadería, ya que, a nivel mundial, se estima una pérdida de 2.5 billones de dólares anuales en países tropicales y subtropicales, en los que la garrapata, se encuentra activa durante todo el año, incluso existen regiones, donde no se ha podido establecer la industria ganadera, debido al problema de infestación por garrapatas y a sus enfermedades asociadas (Suárez et al., 2007).

Se ha observado una relación, entre la reducción de la ganancia de peso y el total de garrapatas, donde se estima, que la ingurgitación de una garrapata de esta especie causa la pérdida de 450 g de peso de un bovino por año (Villar et al., 1996).

Las pérdidas por mortalidad en infestaciones masivas con 78 a 103 garrapatas, por un periodo de 4 a 6 semanas, se calculan en un 4 a 6%, los daños a las pieles se estiman en un 5%, en cuanto a la producción de leche, se calculan en un 14 a 20% en explotaciones semi-intensivas, con un periodo de recuperación de 15 a 30 días post-tratamiento; por otro lado, también se ha visto, que las infestaciones ocasionan un incremento del 7 al 9% en la presentación de enfermedades enzoóticas. Así también, afectan la esfera reproductiva de sus hospederos, bajando los índices de fertilidad (Castellanos, 2018).

Los efectos directos ocasionados por la garrapata son; los daños a la piel de los bovinos, con un 5 a 10%, disminución en la producción de carne en un 15% aproximadamente, lo que corresponde a una pérdida de entre 25 a 60 kg de peso vivo que

dejan de ganar anualmente los animales infestados y la disminución en la producción de láctea, con un 15 a 20% (Castellanos, 2018).

Las pérdidas indirectas son: la transmisión de enfermedades como la Anaplasmosis y la Babesiosis bovina, la reducción en los parámetros reproductivos (abortos e intervalo entre partos incrementado), la presencia de poblaciones de garrapatas resistentes a los ixodicidas, la cual, amenaza seriamente la exportación de ganado bovino a los Estados Unidos, ya que es una actividad rentable para los ganaderos, que genera divisas por el orden de 500 a 700 millones de dólares anuales (González, 2009).

Lo antes mencionado, retrasa las metas de avance de la campaña, para pasar de control a erradicación y de ésta a libre de garrapata, restringe la movilización animal, dificulta la introducción de razas altamente productivas en regiones en donde existe garrapatas. A estas pérdidas debe añadirse; el costo de los productos químicos y la mano de obra para su control, además de los costos en el tratamiento de enfermedades hemoparasitarias transmitidas, gastos de investigación para producir productos de punta, tales como; endectocidas, fenilpirazolonas, inhibidores del crecimiento de los insectos e inmunógenos entre otros, que sean menos agresivos para el medio ambiente y resuelvan o controlen el problema de las poblaciones de garrapatas resistentes a acaricidas (Castellanos, 2018). Actualmente en México, se puede presentar hasta cuatro generaciones por año, estimándose pérdidas de hasta 573.61 millones de dólares por año (Rodríguez-Vivas et al. 2017).

2.3. Control químico

El uso de acaricidas sintéticos, es el método de control más común (Spickett, 1994). Este se remonta a 1895, con el uso de los compuestos arsenicales. Posteriormente, se usaron los carbamatos, los organoclorados, los organofosforados, las amidinas y los piretroides (Sutherst et al., 1983).

A mediados de los años 50, los organofosforados sustituyeron a los organoclorados (George et al., 2008), inhibiendo la acetilcolinesterasa (AChE) en las uniones sinápticas (responsables de la hidrólisis de la acetilcolina) por fosforilación, lo que provoca, actividad continua entre las neuronas con pérdida de coordinación nerviosa (Lagunes & Villaveva-Jimenez, 1999).

El uso de las amidinas o formamidinas, surgió a mediados de los años 70 (George et al., 2008; Andreotti, 2016), su mecanismo de acción es de interferencia en la fosforilación oxidativa, inhibiendo la acción de la enzima monoamino oxidasa, afectando la transmisión de fibras nerviosas adrenérgicas e interfiriendo en el metabolismo de las catecolaminas. En las garrapatas, actúa inhibiendo la octopamina, lo que provoca hiperexcitabilidad, parálisis y muerte. Esto hace, que las garrapatas no se puedan fijar a los hospederos y se suelten, también tiene un efecto repelente, conocido como; acción de derribe (Miller et al., 2007).

En el año de 1977, surgieron los piretroides (George et al., 2008), los cuales afectan el sistema nervioso central y periférico, lo que ocasiona descargas continuas, seguidas de convulsiones. Actúan en la neurotransmisión axonal, en el sitio de reconocimiento de los canales dependientes de sodio, bloqueando el transporte de sodio, lo que potencia la inactivación del canal y prolonga la apertura del canal durante la despolarización e induce una corriente residual de actividad lenta (Casida & Durkin, 2013). Estos acaricidas, no deben aplicarse en vacas lecheras y deben tomarse largos períodos después de su aplicación en bovinos de carne; por lo tanto, su aplicación en bovinos próximos a ser sacrificados no es posible (Benavides et al, 2000).

La eficacia en el control de las garrapatas por medio de los acaricidas sintéticos, no depende solamente de la actividad del acaricida, sino de otros factores muy importantes, como son: la periodicidad del baño, la aplicación, la calidad y la concentración del producto, entre otros (Rajput et al., 2006).

2.3.1. Mezclas de acaricidas y sinergistas

Para mejorar la eficacia de los acaricidas en el control de garrapatas en los bovinos, se han usado mezclas de acaricidas y formulaciones con sinergistas. Uno de los principales usos de las mezclas, es la posibilidad de usarlos para el control de garrapatas y moscas de los cuernos (*Haematobia irritans*). Varios organofosforados sinergizan la acción de los piretroides, como la deltametrina y cipermetrina. En México, las mezclas disponibles en el mercado y que se usan con mayor frecuencia son clorpirifós + permetrina, flumetrina + ciflutrina y cimiazol + cipermetrina (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006).

Los principales sinergistas que se han usado como potencializadores de acción de los acaricidas para el control de las garrapatas son: trifenilfosfato (un inhibidor de la

esterasa), butóxido de piperonilo (PBO) (un inhibidor del citocromo P-450 monooxigenasas), dietil maleato (un inhibidor de la glutathion-S-transferasas) y verbutina (un inhibidor de ciertas isoformas del citocromo P450) (Li et al. 2007). Li et al. (2010), demostraron que el uso del PBO y la verbutina potencializan la acción de la permetrina, amitraz y coumafós. Rodríguez-Vivas et al. (2013), evaluaron en condiciones *in vitro* e *in vivo* la eficacia de la mezcla de cipermetrina + amitraz + PBO para el control de *R. (B.) microplus* resistente a los piretroides en el trópico mexicano. Los resultados revelaron que esta mezcla fue efectiva para matar garrapatas resistentes en condiciones *in vitro* (96.7-100% de mortalidad larval) y a nivel de campo (>95% de eficacia, 28 días post-tratamiento).

2.4. Resistencia de *R. (B.) microplus* a los acaricidas

El desarrollo de la resistencia de *R. (B.) microplus* hacia los acaricidas, ha venido generando serios problemas en la pecuaria bovina, relacionado principalmente a los factores biológicos o intrínsecos de la garrapata (cambios en el metabolismo por la expresión de alelos dominantes resistentes), lo que se debe al factor operacional, como es; la aplicación inadecuada de los acaricidas y fallas en el diagnóstico de la resistencia. La resistencia, es la capacidad desarrollada por una población determinada de artrópodos, a no ser afectada, por la aplicación de insecticidas o acaricidas (FAO, 1979). Sin embargo, también puede definirse como “la habilidad complementaria y hereditaria, propia de un individuo o conjunto de ellos, que los capacita fisiológica y etológicamente, para bloquear la acción tóxica de un insecticida, por medio de mecanismos metabólicos y en consecuencia, sobrevivir a la exposición de dosis, que para otros sería letal” (Lagunes & Villanueva, 1999). A continuación, se muestran los diferentes tipos de resistencia:

1. Múltiple: La población, posee varios mecanismos de resistencia en forma simultánea, por lo que adquiere resistencia a varios insecticidas, aunque no hayan sido aplicados (Bisset, 2002).

2. Cruzada: Al aplicar un insecticida, la población desarrolla resistencia, tanto a este insecticida, como a otros que no hayan sido aplicados, pero que estén relacionados toxicológicamente por al menos un mecanismo de resistencia común (Lagunes & Villanueva, 1999).

3. Cruzada negativa: Se presenta, cuando una población resistente, regresa a una susceptibilidad cercana a la original, al aplicar otro insecticida toxicológicamente diferente (Lagunes & Villanueva, 1999).

El uso irracional de los acaricidas ha causado la aparición progresiva de cepas de garrapatas resistentes en campo. Se dice que la resistencia, es un proceso evolutivo, el cual actúa por selección genética y consta de 3 etapas (Lee et al., 1999):

- Etapa de establecimiento: Aparición del alelo resistente, a través de mutaciones naturales e independientes a la presión de selección, por una tasa proporcional al tamaño de la población. En algunos casos, este alelo, ya está presente antes del primer contacto de las garrapatas al acaricida.
- Etapa de desarrollo: Se tiene un incremento en el número de individuos resistentes, que se presenta gracias a la sobrevivencia de estos a los compuestos químicos, en relación con la tasa de mortalidad de individuos susceptibles.
- Etapa de emergencia: El alelo resistente, ya se considera un gen común distribuido entre la población, el cual repercutirá directo en campo y se notará en la ineficacia de los productos.

2.4.1. Mecanismos de resistencia de *R. (B.) microplus*

La resistencia en *R. (B.) microplus* es un fenómeno multifacético, que envuelve principalmente dos tipos de mecanismos; el tipo metabólico o enzimático, que consiste en la sobreproducción de enzimas, que metabolizan y detoxifican el acaricida, inhibiendo o previniendo que actúe sobre el sitio de acción (Hemingway et al., 2004). El segundo mecanismo, es el molecular, produciéndose mutaciones en los genes, que codifican las proteínas que son el sitio de acción de los acaricidas (Stenhouse et al., 2013). Cabe mencionar, la resistencia por comportamiento (Sparks et al., 1989) y por penetración reducida (Bisset, 2002).

2.4.1.1. Resistencia metabólica

De manera normal, los insectos están expuestos a toxinas en sus dietas o a través de la aplicación de insecticidas (Chapman, 2013). En la mayoría de los insectos, los tóxicos son excretados, no sin antes ser metabolizados. La resistencia metabólica, envuelve alteraciones en el incremento de la expresión de un complejo de enzimas

detoxificativas, como son; las oxidasas de función múltiple, glutatión-S-transferasas (GST) y esterasas (Bisset, 2002).

El citocromo P450 es una familia de enzimas que se une a compuestos tóxicos, resultando en su oxidación, haciéndolos más solubles y por lo tanto de más fácil excreción (Hemingway J., 2002). Son responsables de la desintoxicación de los piretroides y organofosforados en los artrópodos, incluyendo *R. (B.) microplus* (Lee et al., 2002). Existen estudios de la evaluación de la actividad del complejo citocromo P450, asociados a la resistencia a organofosforados y piretroides (Gosh et al., 2015).

De igual forma, la glutatión S-transferasa (GST) es una familia de enzimas, que participan en la resistencia a organofosforados, organoclorados y piretroides. Desempeñan un rol en la detoxificación y antioxidación celular, conjugando el glutatión reducido, con los centros electrofílicos de los acaricidas. El mayor papel de las GST hacia los organofosforados es la detoxificación del acaricida, por la reacción de conjugación con el glutatión, resultando en una desalquilación o desarilación (Lumjuan et al., 2007).

Otro grupo enzimático, son las esterasas, implicadas en la desintoxicación de organofosforados, en particular la AChE y la CaE. En los organofosforados, inhiben la fosforilación enzimática (Ranson et al., 2002). La resistencia a organofosforados y carbamatos, producto de la acción de las esterasas, es común en garrapatas. Existen reportes de la alta actividad de carboxilesterasa en garrapatas resistentes a piretroides (Jamroz et al. 2000), de igual forma, la producción alterada de acetilcolinesterasa está relacionada con la resistencia a organofosforados (Gosh et al. 2015; Fournier & Mutero, 1997; Baxter & Barker 1998; y Rosario-Cruz et al., 2009).

2.4.1.2. Resistencia por mutaciones en garrapatas

Otro mecanismo importante, es la insensibilidad del sitio de acción, que resulta de la modificación estructural o mutaciones puntuales de genes, que codifican proteínas, que interactúan con insecticidas o acaricidas (Casida & Durkin, 2013).

Las mutaciones knock down resistance (kdr), propician la resistencia no metabólica, ya que actúan, contra la acción de la parálisis rápida, ocasionada por los piretroides, reduciendo la sensibilidad en los canales de sodio (Linss et al. 2014). Otras mutaciones, conducen a la producción de una AChE alterada, insensible a la inhibición por los organofosforados (Rosario-Cruz et al., 2009) y mutaciones con sentido, que

posiblemente traducen aminoácidos, que alteran el receptor de octopamina y que resultan en la resistencia a las amidinas (Chen et al., 2007).

2.5. Diagnóstico de la resistencia por bioensayos

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), recomienda obtener las garrapatas de alta calidad, para el trabajo en el laboratorio (FAO, 1999). Las principales recomendaciones son:

- Número de garrapatas: Colectar el mayor número de garrapatas hembras repletas (teleoginas), de ser posible (20-50) de al menos 10 a 15 animales de la unidad de producción bovina, cuidando principalmente no lesionar el hipostoma de la garrapata al momento de desprenderla de los bovinos.
- Hora de muestreo: La mayor cantidad de teleoginas, se obtiene en las horas tempranas del día, antes de que los rayos solares incidan directamente sobre los animales, ya que esto estimula el desprendimiento natural de las garrapatas. Antes de la colecta, se debe evitar el arreo de los animales de los potreros a los corrales, ya que el movimiento y el calor generado por los animales, estimula la caída de las teleoginas. Se recomienda dejar a los animales a muestrear en un corral durante la noche y realizar el muestreo por la mañana.
- Tiempo con relación al tratamiento acaricida: Depende directamente del acaricida en uso, su efecto residual, si tiene un alto efecto y rápido o si su efecto máximo es retardado, así como la especie de garrapata que se desea colectar. La garrapata *R. (B.) microplus* es de un solo hospedero, es decir, sus mudas de larva a ninfa y de ninfa a adulta se realizan en el mismo hospedador. Durante los periodos de muda, las garrapatas son menos susceptibles a los acaricidas, debido a la falta de capacidad de penetrar la doble cutícula alrededor de estos estadios. Lo anterior indica que, en las garrapatas ingurgitadas que se alimentaron de 9 a 14 días después del tratamiento, es menos probable determinar una verdadera resistencia genética. Es recomendable, usar teleoginas colectadas entre el día 3 a 8 o 14 a 17 postratamiento, para realizar la prueba de resistencia. Si se usan lactonas macrocíclicas, es esencial colectar tres días o más después del tratamiento y si se usa fluazurón, al menos 15 días después del tratamiento.

- Transporte de garrapatas: Se deben transportar en recipientes con pequeños orificios en las tapas, para permitir la circulación del aire. Si se transportan a grandes distancias, los recipientes deben de ser depositados en una cámara húmeda (se puede utilizar una caja de plástico) que contenga en la base un papel o algodón ligeramente húmedo. Esto es, para formar un medio húmedo y oscuro que permita la incubación de las teleoginas. Se debe evitar exponer las garrapatas a la luz solar directa y a altas temperaturas.

2.5.1. Manejo de las teleoginas para la producción de larvas

Las teleoginas, deben de ser depositadas en cajas de Petri de plástico o vidrio, dentro de una cámara húmeda (80-90% humedad) en completa oscuridad y a una temperatura controlada de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, con la finalidad de que efectúen la ovoposición. Ya que la ovoposición concluye (dos semanas después), los huevos se colectan y se depositan en viales de vidrio con tapón de algodón y se someten a las mismas condiciones de temperatura y humedad al que fueron expuestas las teleoginas, para esperar la eclosión (dos semanas más). Una vez que las larvas eclosionan, se espera a que tengan una edad de siete a 14 días (cinco-seis semanas post colecta), para ser sometidas al diagnóstico de resistencia para organofosforados, piretroides y amidinas (FAO, 2004).

2.5.2. Prueba de Paquete de Larvas

Esta prueba fue descrita por Stone y Haydock (1962) y posteriormente modificada por la FAO (1971), se usa ampliamente para la caracterización de cepas, detección y estudio de fenómenos de resistencia a acaricidas en garrapatas y se reconoce de manera internacional, debido a su gran utilidad práctica. Esta prueba consiste en la exposición de larvas de garrapata *R. (B.) microplus* de siete a 15 días de edad en papeles filtro impregnados con una dosis discriminante (DD) o distintas concentraciones de algún químico (organofosforados y piretroides), con el objetivo de obtener porcentajes de mortalidad del orden de 0 a 100 (Santamaría y Soberanes, 2001).

2.5.3. Prueba de Inmersión de Larvas

También conocida como prueba de Sándwich o de Shaw, esta prueba fue descrita por Shaw (1966) y modificada por la FAO (1984). Consiste en la inmersión, entre dos papeles filtro, de larvas de siete a 14 días de edad en suspensiones de acaricidas, a partir

de concentrados emulsionables disponibles en el mercado durante un periodo de 10 minutos, posteriormente se retiran y se colocan en un sobre de papel filtro, incubándose a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ con humedad relativa del 80-90%, realizándose la lectura de los resultados a las 72 horas posteriores al tratamiento, el objetivo de esta prueba es similar a la Prueba de Paquete de Larvas.

2.5.4. Prueba de Inmersión de Adultas

Esta prueba se basa en la inmersión de hembras repletas descrita por Drummond et al. (1967), modificada por la FAO (1999). La prueba consiste, en sumergir en diferentes concentraciones de acaricidas a garrapatas adultas ingurgitadas por un periodo de 1 a 30 minutos, incubarlas a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 80-90% de humedad relativa por siete días y posteriormente realizar la lectura de los resultados. Esta prueba presenta dos modalidades:

1. La prueba biológica (realizada con la concentración comercial recomendada del acaricida), con el objetivo de determinar el porcentaje de mortalidad y la inhibición de la ovoposición en garrapatas adultas expuestas a un producto a la concentración comercial recomendada.
2. El bioensayo de concentraciones múltiples, a fin de realizar un análisis Probit (Santamaría y Soberanes, 2001).

2.6. Situación de la resistencia en México

Desde el 2010, se cuenta con garrapatas resistentes a tres o cuatro familias de garrapaticidas (Organofosforados-Piretroides-Amitraz y Fipronil) en la mayor parte del territorio nacional (SENASICA, 2016). Los estados de Nuevo León y Veracruz presentan resistencia a tres o cuatro familias (Figura 5).

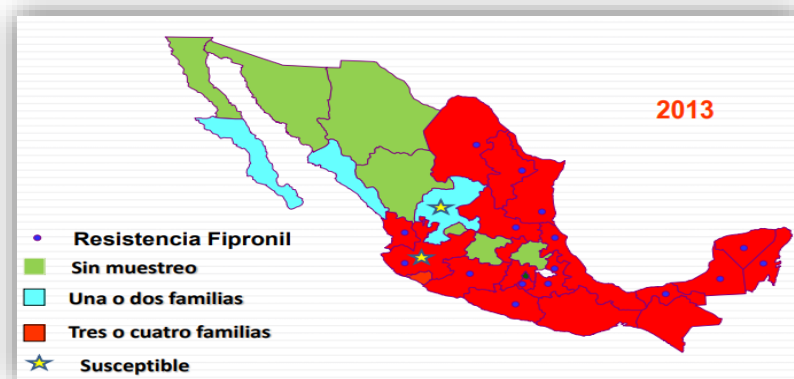


Figura 5: Distribución de cepas de *R. (B.) microplus* en México, con resistencia a dos, tres o cuatro familias en el 2013. (SENASICA, 2016).

2.7. Alternativas fitoterapéuticas

El interés del público en las terapias naturales se ha aumentado en los países industrializados. Las alternativas fitoterapéuticas presentan importantes ventajas, cuando son comparados con los acaricidas sintéticos, por ejemplo: la obtención a partir de recursos renovables, rápidamente degradables, selectivos y de baja fitotoxicidad, lo que reduce su impacto a organismos benéficos, al hombre y al ambiente, presentando un lento desarrollo de la resistencia, sin residuos en los alimentos, de rápida acción y de fácil acceso (Roel et al., 2001; Cloyd et al., 2004). Los insecticidas botánicos, pueden ser usados dependiendo de la preparación y esta puede ser como: producto *in natura* (crudo), polvo, extracto acuoso o alcohólico, aceites esenciales, formulaciones concentradas comerciales y semi comerciales, purificación y aislamiento de compuestos puros de extractos de plantas y modelos de moléculas para nuevos agroquímicos (Moreira et al., 2007; Menezes, 2005; Campos et al., 2012).

Existen varios estudios, con evaluación de aceites esenciales y extractos de origen vegetal frente a larvas y teleoginas de *R. (B.) microplus* (Borges et al., 2011). Los extractos de plantas y metabolitos secundarios tienen buena eficacia para el control de *R. (B.) microplus* (> 80%). En México, Rosado-Aguilar et al. (2010), evaluaron la eficacia de 45 extractos metanólicos de plantas en larvas de *R. (B.) microplus*, reportando eficacias del 5 al 99% y en adultas (utilizando los extractos de *Petiveria alliacea*) reportaron un 86% de eficacia y un 91% de reducción en el índice de eficiencia reproductiva. Martínez M. (2011), reportó 100% de eficacia para el control de larvas, usando extractos de *Cuminum cyminum* y *Pimenta dioica*, mientras que Villarreal et al. (2017), demostraron el poder acaricida del aceite esencial del comino sobre adultas, presentando 100% de mortalidad. Recientemente, Arceo et al., (2016) evaluaron seis compuestos, que se encontraron en la fracción activa de *P. alliacea* para el control de *R. (B.) microplus*. Los autores evaluaron los compuestos individuales y 57 mezclas de los metabolitos. La mezcla de benciltrisulfuro + bencildisulfuro, produjo una clara sinergia para el control eficiente de larvas (93% de mortalidad) y adultas (98% de inhibición de la eclosión de larvas) de *R. (B.) microplus* resistentes a acaricidas. Por otro lado, los aceites esenciales o volátiles y fijos son mezclas de compuestos orgánicos de bajo peso molecular y se originan a partir de los metabolitos secundarios de plantas aromáticas. Los monoterpenos y sesquiterpenos,

como los fenilpropanoides, son los principales componentes de los aceites esenciales, ya que confieren sus características organolépticas (Campos et al., 2012).

2.7.1. Género Cordia

Este género se ha estudiado por su actividad biológica frente a distintos microorganismos, consiste en aproximadamente 320 especies, en su mayoría siendo árboles, arbustos o hierbas, distribuidos en el sur y centro de América, Asia, sur y este de África, y en Australia (Owis, 2014).

Algunas especies de *Cordia*, se caracterizan por el aroma que liberan de las hojas, debido a la presencia de hidrocarburos terpénicos y sus derivados oxigenados (aceite esencial), que son de interés para las industrias de: perfumes, cosméticos, alimentos y fármacos, siendo algunas de estas de uso medicinal importante: *Cordia boissieri*, *Cordia myxa* y *Cordia sebestena* (Rapisarda et al., 1997).

2.7.1.1. *Cordia boissieri*

La planta que se utilizó para este estudio corresponde a *Cordia boissieri* (Figura 6) de nombre común anacahuita. Es un árbol perenne que puede llegar a medir hasta 4 metros de altura, con hojas alternas y simples. Los frutos son drupas o bayas. Es una planta común y su flor blanca es representativa del estado de Nuevo León. Es nativa del Valle del Río Grande en Texas, hasta gran parte del territorio de Nuevo León. Es empleada para afecciones respiratorias tales como; tuberculosis, tos, asma, bronquitis, catarrros y bronquiolitis (Alanís et al., 1996; Owis, 2014; Molina et al., 2007). Estudios con *C. boissieri* han demostrado, que los aceites esenciales obtenidos a partir de las flores presentan componentes activos, como: el espatulenol y el cariofileno; encontrando a los sesquiterpenos, como la clase de metabolitos secundarios predominante (Owis, 2014), con potencial antimicrobiano contra *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* (Molina et al., 2007). La taxonomía de la planta *C. boissieri* (Feuillet, 2017):

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Familia: Boraginaceae

Orden: Lamiales

Género: Cordia

Especie: *boissieri*



Figura 6: Árbol de *C. boissieri* en el municipio de San Nicolás de los Garza Nuevo León.

2.7.2. Género Artemisia

El género Artemisia, es uno de los géneros más grandes pertenecientes a la familia Asterales, que consta de más de 350 especies. Se distribuye predominantemente en las regiones templadas del mundo, en áreas de precipitación de 0 a 50 cm, muchas especies se han utilizado desde la antigüedad como remedios caseros para algunos propósitos de tratamiento (reducción de la flema, alivio de la tos, vigorización de la circulación sanguínea, detención del dolor, inducción del sudor, diuresis, anti-hipertensión, antihelmíntico, antitóxico y antialérgico). Según la literatura, se han investigado más de 260 especies de Artemisia, para revelar que contienen muchas clases de metabolitos secundarios, incluidos los: terpenoides, flavonoides, cumarinas, glucósidos, esteroides y poli acetilenos (Tan et al., 1998).

2.7.2.1. Artemisia ludoviciana

Es también conocida por su nombre común "Estafiate", es una hierba que puede medir hasta un metro de altura, sus hojas contienen una pubescencia 4 en el envés y muy aromáticas al estrujarse; sus flores son de color amarillo. El clima cálido y seco es

considerado como su hábitat principal, mediante una propagación por semilla y disponible durante todo el año, ya sea por medio cultivado o silvestre (Jiménez M., 2011). Es considerada como uno de los más grandes géneros de Asteraceae, se encuentra ampliamente distribuida en el hemisferio norte (Zavala S. et al., 2002). Se emplea para el tratamiento de la diarrea, la disentería, parásitos, dolor abdominal, vómitos y dolor de estómago. Además, se utiliza como agente antiespasmódico. Por otra parte, debido a sus propiedades antiespasmódicas, se determinó su efecto vasodilatador sobre su actividad relajante del endotelio intacto y anillos del endotelio de aorta de rata y en los anillos traqueales (Estrada-Soto et al., 2012). La taxonomía de la planta *Artemisia ludoviciana* (Shultz, 2018):

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Familia: Asterales

Orden: Asteraceae

Género: *Artemisia*

Especie: *ludoviciana*

2.7.3. *Litchi chinensis*

Litchi chinensis es conocida como la cereza china, lichi de montaña y lichi de agua, es un árbol de hoja perenne subtropical de tamaño mediano, con alto valor comercial, debido al consumo mundial de sus frutos (Figura 7). (Menzel & Waite, 2005). Se distribuye principalmente en el sudeste asiático, especialmente en: China, Vietnam, Indonesia, Tailandia y Filipinas, pero ahora se cultiva como un cultivo económico en muchos países de todo el mundo, por sus dulces frutas (Jiang et al., 2013; Gontier et al., 2000). Su fruto, tiene un pericarpio rojo brillante y atractivo, que rodea un arilo carnoso blanco y translúcido, con un olor dulce a rosa, delicioso sabor y buen valor nutricional (Bhoopat et al., 2011). Ha sido aceptado gradualmente por los consumidores y ha establecido una gran popularidad en el mercado internacional. La fruta se puede comer directamente y también se puede utilizar para la fabricación de jugo, vinagre, gelatina y vino (Alves et al., 2011; Saxena et al., 2011). Informes médicos recientes, han demostrado que las frutas y semillas de *L. chinensis* impiden el crecimiento de las células cancerosas

(Bhat & Al-Daihan, 2014). Son fuentes ricas en flavonoides, que son muy efectivas contra el cáncer de seno (Xu et al., 2011). Además, los frutos y las semillas poseen muchas bioactividades como: hipoglucemiante, anticancerígeno, antibacteriano, anti-hiperlipidémico, antiplaquetario y antiviral (Figura 8) (Xu et al., 2011; Chen et al., 2007). En las últimas décadas, se han aislado muchos compuestos de *L. chinensis*, incluidos: flavonoides, ácidos fenólicos, proantocianidinas, antocianinas, cumarinas, lignanos, cromanos, sesquiterpenos, ácidos grasos, esteroides y triterpenos de diversas partes de la planta (Ibrahim & Mohamed 2015). Taxonomía de la planta *L. chinensis* (Acevedo, 2017):

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Familia: Sapindaceae

Orden: Sapindales

Género: Litchi Sonn

Especie: *chinensis*



Figura 7: *L. chinensis*. A=Fruto con cascara, B=fruto sin cascara y C=Semilla (Ibrahim & Mohamed 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

R. (B.) microplus presenta una prevalencia del 65.90% en México con un alto impacto en la economía nacional pecuaria, con pérdidas anuales que oscilan los 573.61 millones de dólares, debido a sus efectos directos e indirectos causados en la ganadería. El uso de acaricidas sintéticos, es el método de control más utilizado, sin embargo, ocasiona diversos problemas en el ambiente, en el ganado y en la salud pública, por su efecto tóxico y debido a su poder residual, además de que su uso continuo, indiscriminado y mal aplicado, ha generado poblaciones de garrapatas resistentes de hasta cinco principios activos en diferentes estados de la República Mexicana, debido a una respuesta fisiológica, como el aumento de la detoxificación enzimática, originando resistencia metabólica frente a dichos productos químicos. Por lo anterior, se han implementado técnicas para mejorar la eficacia de los acaricidas, como las mezclas y formulaciones con sinergistas, originando que el control químico, sea cada vez más complicado y costoso. Por otra parte, el empleo de plantas con actividad terapéutica es una práctica muy difundida en México, ya que se ha reportado que las plantas contienen principios activos cuya actividad resulta favorable para combatir diversos grupos de artrópodos y microorganismos. En este contexto, el presente trabajo, propone caracterizar de manera bioquímica dos poblaciones de larvas de *R. (B.) microplus*, una del estado de Nuevo León (N.L) y otra de Veracruz (Ver.). Además, evaluar la actividad acaricida *in vitro* de tres extractos metanólicos, uno obtenido a partir de la semilla de *Litchi chinensis* y dos a partir de hojas de *Artemisia ludoviciana* y *Cordia boissieri*, así como tres ixodicidas de uso común. Esto con el fin de desarrollar y promover nuevas medidas de manejo, capaces de reducir y controlar infestaciones de garrapatas, reduciendo el uso de acaricidas sintéticos.

4. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de *Artemisia ludoviciana*, *Cordia boissieri* y *Litchi chinensis*, presentarán actividad acaricida frente a larvas de *R. (B.) microplus in vitro*.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la actividad enzimática de dos poblaciones diferentes de larvas de *R. (B.) microplus* y evaluar el efecto acaricida *in vitro* de extractos metanólicos de *A. ludoviciana*, *C. boissieri* y *L. chinensis*, así como de tres acaricidas sintéticos de uso común en dichas poblaciones.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener y caracterizar de manera preliminar, los extractos metanólicos de *A. ludoviciana*, *C. boissieri* y *L. chinensis*.
2. Evaluar la actividad enzimática de la Acetilcolinesterasa (AChE), Carboxilesterasa (CaE), Glutación-S-Transferasa (GST) y Fosfatasa Alcalina (ALP), en dos poblaciones diferentes de larvas de *R. (B.) microplus*.
3. Evaluar los extractos metanólicos de las plantas antes mencionadas, así como un piretroide, un organofosforado y una asociación piretroide/organofosforado en las dos poblaciones de larvas antes mencionadas.
4. Comparar la actividad enzimática, así como los efectos acaricidas de los extractos y los acaricidas sintéticos, mediante un análisis estadístico.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Colecta de plantas

Las semillas de *Litchi chinensis*, fueron colectadas en Veracruz, Ver. (22°28'17.09" N y 93°36'39.9" W). Las hojas de *Artemisia ludoviciana* (estafiate), se colectaron en el municipio de Guadalupe, N.L. (25°42'07.6" N y 100°11'33.9" W) y las hojas de *Cordia boissieri* (anacahuíta), fueron colectadas en el municipio de Higuera, N.L. (25°57'50.9" N y 100°01'15.2" W).

7.2. Obtención de los extractos

El material vegetal (hojas para *A. ludoviciana* y *C. boissieri*, y semillas para *L. chinensis*) se lavó, se secó en la estufa a 25°C y se cortó en pequeños trozos. La obtención de extractos se llevó a cabo en equipos Soxhlet, en donde se colocaron 70 g de material vegetal y aproximadamente 700 ml del solvente, posteriormente se mantuvo durante 24 horas en reflujo y el volumen de solvente obtenido, se evaporó en un rotavapor a 30°C y a presión reducida. Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento con metanol. El extracto obtenido, se dejó secar en la estufa a 25 °C para eliminar el exceso de solvente, posteriormente se mantuvo en refrigeración. El cálculo del rendimiento de la extracción se obtuvo de la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{PE}{PI} \times 100$$

Dónde:

PE = Peso obtenido después de la extracción.

PI = Peso inicial del material vegetal a extraer.

7.3. Análisis de la cromatografía en capa fina

Los extractos fueron analizados para su preidentificación mediante cromatografía en capa fina, utilizando placas de sílica gel de 60 F264 TLC (Merck®). Individualmente, una cantidad del extracto fue diluida en el solvente, posteriormente, se colocó en la parte inferior de las placas, aproximadamente a 1.5 cm del borde con ayuda de un capilar, aplicando puntos consecutivos del extracto para formar una línea continua en la placa. Las placas fueron eluidas, utilizando como fase móvil cloroformo-metanol 9:1 y Benceno-Acetona 7:3. Las placas fueron retiradas del sistema cuando la fase móvil se encontraba

aproximadamente a 1.5 cm del borde superior de la placa, una vez retiradas, se realizaron observaciones bajo la luz UV para observar con mayor claridad la separación de las bandas al igual que con cloruro de cobalto.

7.4. Caracterización fitoquímica

Se realizaron las pruebas fitoquímicas para los extractos metanólicos de hojas de *A. ludoviciana*, *C. boissieri*, y de semillas de *L. chinensis*, descritas en la Tabla 1.

Tabla. 1. Pruebas fitoquímicas efectuadas en la caracterización de los extractos.

Grupo químico <i>Ensayo</i>	Método	Posibles observaciones
Esteroles y triterpenos <i>Prueba de liebermann-Buchard</i>	Se mezcló 1 ml de anhídrido acético y uno de cloroformo, se enfrió a 0 °C y se añadió una gota de ácido sulfúrico. De gota en gota se añadió este reactivo a la muestra.	Si hay formación de colores azules, verde, rojo, anaranjado, etc., los que cambian con el tiempo, la prueba será positiva.
Sesquiterpenlactonas <i>Prueba de Baljet</i>	A 1-2 mg del compuesto, se le agregaron 3-4 gotas de la solución mezcla.	Es positiva si se torna de color naranja a rojo oscuro.
Coumarinas <i>NaOH/HCl</i>	Se disolvió la muestra en NaOH al 10%, posteriormente se agregó HCl.	Si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular es positiva.
Saponinas <i>H₂O</i>	Se agregó agua a la muestra y se agitó vigorosamente por un minuto.	La presencia de burbujas indica que es positivo.
Flavonoides <i>Prueba de Shinoda</i>	En un tubo de ensayo 13 x 100 mm se colocó 1-2 mg de la muestra y 1 ml de etanol, se agregó una limadura de magnesio y después se le agregaron unas gotas de HCl.	Se considera la prueba positiva si se presentan colores naranja, rojo, azul, y violeta.
Taninos vegetales <i>Prueba de FeCl₃</i>	Se añadió unas gotas de cloruro de hierro al 12.5% en agua.	La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde es considerado positivo.
Carbohidratos <i>Prueba de Molish</i>	En un tubo de ensayo de 13x100 mm se colocó 1-2 mg de la muestra, se la agregó de gota en gota el reactivo de Molish (alfa-naftol al 1% en etanol), luego 1 ml de ácido sulfúrico por las paredes.	La prueba es positiva cuando se forma un anillo coloreado en la interfase de color púrpura.
Alcaloides <i>Prueba de Dragendorff</i>	Se le añadió de 2 a 3 gotas de los reactivos A: Nitrato de bismuto y ácido acético glacial y B: Yoduro de potasio.	La aparición de una coloración naranja rojizo se considera positiva.

7.5. Colecta de garrapatas

La colecta de los especímenes de garrapatas se realizó a partir de dos poblaciones, una proveniente del municipio de General Bravo (25°42'07.6" N y 100°11'33.9" W), en el estado de Nuevo León (Figura 8) y otra en el municipio de Tantoyuca (21°21'07.6" N

y 98°14" W), en el estado de Veracruz (Figura 9). Las muestras se colectaron según las recomendaciones de la FAO (1999). Las hembras ingurgitadas se transportaron al Laboratorio De Una Sola Salud, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (F.M.V.Z) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L).



Figura 8: General Bravo, Nuevo León.



Figura 9: Tantoyuca, Veracruz.

7.6. Identificación de las garrapatas

Las garrapatas colectadas se identificaron mediante la observación de sus caracteres morfológicos, utilizando las claves de Dantas-Torres (2019) y Hoskins (1991), en el Laboratorio De Una Sola Salud, en la F.M.V.Z de la U.A.N.L.

7.7. Establecimiento de las poblaciones en el laboratorio

Las teleoginas se depositaron en cajas de Petri, dentro de una incubadora BOD con una humedad relativa del 80-90%, en completa oscuridad y a una temperatura controlada de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con la finalidad de que las teleoginas efectuaran la oviposición. Ya que la oviposición concluyó (dos semanas después), los huevos se colectaron y se depositaron en tubos de vidrio de 10 mL, cerrados con una tela y una liga, y se sometieron a las mismas condiciones de temperatura y humedad a las que fueron expuestas las teleoginas para esperar la eclosión, el tiempo de incubación fue de dos semanas más. Una vez que las larvas eclosionaron, se esperó a que tuvieran una edad de siete a 14 días (cinco-seis semanas post-colecta), para ser sometidas a las pruebas tanto para los extractos de las plantas, como para los acaricidas sintéticos (FAO, 2004).

7.8. Evaluación de actividad enzimática de las poblaciones

7.8.1. Obtención de los extractos enzimáticos

Se realizó en el Laboratorio de Virología de la F.M.V.Z de la U.A.N.L, se realizaron pools de 100 mg de larvas de *R. (B.) microplus* de 14 a 21 días, en 10 volúmenes (1:10) de buffer de fosfato 50 mM refrigerado (pH 7,0) con Triton-X 100 al 0,5%, los cuales se homogeneizaron en el FastPrep®-24 (MP Biomedicals), modificado a 2,500 rpm durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes resultantes se utilizaron como fuente de las enzimas, de los cuales, se elaboraron alícuotas de 0.5 mL almacenadas a -120 °C, para luego ser utilizadas en la evaluación de la cinética enzimática de las enzimas: acetilcolinesterasa, carboxilesterasa, Fosfatasa alcalina y Glutación-S-Transferasa.

7.8.2. Actividad de la acetilcolinesterasa (AChE)

La actividad de la cinética enzimática se realizó en el Laboratorio de Reproducción de la F.M.V.Z de la U.A.N.L, utilizando el método descrito por Ellman et al. (1961) y modificado para su aplicación en microplacas por Huang et al. (1997). En cada pozo, se colocó 10µL de muestra de extracto enzimático y posteriormente 280 µL de 2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico (DTNB) en buffer Tampón Fosfato Salino (PBS) (pH 7.1) y se adicionó 10µL de sustrato, cloruro de acetilcolina para AChE, a una concentración final de 0.0005 µM. Para cada población se realizaron dieciocho repeticiones, se incluyeron tres blancos por microplaca, los cuales no contenían enzimas. Para evaluar la cinética enzimática, se midió la degradación del sustrato mediante lecturas espectrofotométricas a 405 nm, cada dos min durante 12 min, teniendo un total de seis lecturas por cada pozo. La actividad enzimática fue expresada como $\mu\text{mol}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ utilizando un coeficiente de extinción molar de $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

7.8.3. Actividad de la carboxilesterasa (CaE)

La cinética enzimática se determinó de forma similar a la de AChE, calculando la variación de la absorbancia durante el tiempo de reacción de la CaE, mediante espectrofotometría en microplacas. Para lo anterior, se realizó un ensayo en el cual se colocó en cada pozo: 10µL extracto enzimático; buffer tris-HCl 50 mM (pH 7.1) y finalmente se agregó el sustrato p-nitrofenilacetato, a una concentración final de 0.0005

M para iniciar la reacción. La actividad enzimática fue expresada como $\mu\text{mol}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ utilizando un coeficiente de extinción molar de $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

7.8.4. Actividad de la Fosfatasa alcalina (ALP)

La actividad de ALP se evaluó mediante espectrometría en microplacas (Moyano et al., 1996), se agregó en cada pozo extracto enzimático, buffer dietanolamina 1.0 M (pH 9.8) con 50 mM MgCl_2 , para iniciar la reacción se agregó el sustrato 4-nitrofenil-fosfato, colocando tres blancos por microplaca, los cuales no contenían enzimas. Para la evaluación de la cinética enzimática, se midió la degradación del sustrato mediante lecturas espectrofotométricas a 405 nm cada 2 min durante 12 min. La actividad enzimática fue expresada como $\mu\text{mol}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ utilizando un coeficiente de extinción molar de $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

7.8.5. Actividad de la Glutación-S-Transferasa (GST)

La actividad de la GST se analizó de acuerdo con Mannervik y Danielson (1988) y Wilce y Parker (1994): la GST cataliza la conjugación de L-glutación con 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), a través del grupo tiol del glutación. El producto de la reacción es el conjugado GS-DNB, el cual absorbe a una longitud de onda de 340 nm, por lo cual se puede considerar que el incremento de absorbancia (340 nm) es directamente proporcional a la actividad de la GST en la muestra. Se realizó una mezcla de reacción con 19.8 mL de buffer de fosfato salino Dulbecco's (pH 7.2), 200 μL de L-glutación reducido 200 mM (G4251 Sigma) y 200 μL de CDNB 100 mM (S2569 Sigma). En cada pozo se agregaron 10 μL del extracto enzimático y 190 μL de la mezcla de reacción, las lecturas de absorbancia se realizaron a 340 nm cada dos min durante 12 min, teniendo un total de seis lecturas de cada pozo. La actividad enzimática fue expresada como $\mu\text{mol}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ utilizando un coeficiente de extinción molar de $13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

7.8.6. Determinación de la concentración de proteína

Para determinar la concentración de proteína en los extractos enzimáticos, se utilizó una modificación del método de Bradford (1976), adaptado para su uso en microplacas. Se utilizó una curva estándar de 0.05 a 0.5 mg de BSA (A-9647, Sigma) por mL de agua destilada. De cada dilución y de las muestras se colocaron 10 μL por pozo

(con 3 repeticiones para las diluciones y 12 repeticiones para las muestras), más 200 µL de solución de trabajo que contenía 85% de agua destilada, 3% etanol al 95%, 6% ácido fosfórico al 88% y 6% de la solución stock de Bradford (100 ml de etanol al 95%, 200 ml de ácido fosfórico al 88% y 350 mg de azul de Coomassie G), pasado dos min se realizó una lectura espectrofotométrica leyeron las placas a 620 nm en un lector de microplacas. (Epoch, BioTek Instruments, US).

7.9. Bioensayos

Se utilizaron larvas de *R. (B.) microplus* de siete a 14 días, se utilizó la Prueba de Paquete de Larvas (PPL) descrita por Stone y Haydock (1962) para los acaricidas sintéticos, modificada para su aplicación en la concentración comercial del acaricida y para los extractos de las plantas, se utilizó la Prueba de Inmersión de Larvas (PIL) descrita por Shaw (1966) y modificada por Santos et al. (2013).

7.9.1. Obtención de los Acaricidas

Los acaricidas se compraron en depósitos veterinarios del área metropolitana. Se utilizaron: el Ticoff (Lapisa) principio activo cipermetrina, perteneciente a la clase de los piretroides, el Asuntol líquido (Bayer) principio activo coumafós, perteneciente a la clase de los organofosforados y el Garra Ban MO 29 (Lapisa), que es una asociación de los principios activos clorpirifós y permetrina, pertenecientes a las clases de los organofosforados y piretroides respectivamente.

7.9.2. Prueba de Paquete de Larvas

Para la realización de esta prueba se utilizó: Papel filtro tipo Whatman del No. 1, tricloroetileno (Tc) como diluyente, aceite de oliva (AO) como fijador, larvas de garrapatas de siete-14 días de edad, agarra papeles y pinceles del No. 4. Se cortaron rectángulos de 8.5 cm de ancho por 7.5 cm de largo de papel filtro, los cuales se doblaron a la mitad a modo de que formaran un sobre y con la ayuda de los agarrapapeles, se cerraron los espacios laterales, quedando sólo el espacio superior para permitir el llenado con las larvas de *R. (B.) microplus*, estos paquetes deben ser rotulados con lápiz. Para la preparación de soluciones, se utilizaron las dosis recomendadas por los fabricantes, como diluyente para todos los productos químicos, se usó el Tc y como fijador el AO, en una proporción de 2:1 respectivamente.

Para la impregnación de los papeles, primero se impregnaron los controles (únicamente Tc y AO) y se continuó con los acaricidas. Los rectángulos de papel filtro se impregnaron con ayuda de una micropipeta de 1 mL de capacidad (1000 µL), se aplicó 0.7 mL de la solución por cada rectángulo en la cara posterior a la identificación y se inició de arriba hacia abajo de lado a lado. Posteriormente los rectángulos se dejaron secar por aproximadamente 30 min (esto con la finalidad de que se evapore el Tc y sólo quede el AO y el acaricida en la superficie del papel), una vez secos se almacenaron envueltos en papel aluminio y se refrigeraron hasta su uso.

El llenado de paquetes se inició con los controles, para colocar las larvas se utilizó un pincel del No. 4, con el que se tomaron de 80 a 100 larvas aproximadamente del borde del tubo y se depositaron en cada paquete, posteriormente se sellaron con los agarrapapeles. Al concluir el llenado de los paquetes, se colocaron en una charola limpia y se introdujeron en la estufa de incubación BOD a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, con una humedad relativa del 80% por 24 h.

La lectura de resultados se realizó 24 h posteriores al tratamiento, iniciando el conteo de las larvas en los paquetes control. Se evaluó el criterio de mortalidad, donde se consideró que todas las larvas que pudieran caminar o deslizarse se contaban como vivas. El criterio de respuesta que se evaluó en la prueba fue la mortalidad. Posteriormente, se realizaron los cálculos de los porcentajes de mortalidad, para la cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{Larvas muertas}}{\text{Larvas totales}} \times 100$$

7.9.3. Prueba de Inmersión de Larvas

Para la realización de esta prueba se utilizó: papel filtro poro fino, tubos tipo eppendorf de 2 mL, mesa agitadora (Shaker), larvas de garrapatas *R. (B.) microplus* de siete-14 días de edad y agarrapapeles. Los rectángulos de papel filtro se prepararon de la misma manera como se menciona en la Prueba de Paquete de Larvas, con la diferencia de que los rectángulos eran de papel filtro poro fino, en la preparación de las diluciones se utilizaron las concentraciones de 50 mg/mL, 100 mg/mL y 150 mg/mL para los extractos de hojas de *A. ludoviciana* y *C. boissieri*, y de semillas de *L. chinensis*, utilizando como

diluyente agua destilada para *C. boissieri* y *L. chinensis* y metanol al 60% para *A. ludoviciana*.

En la inmersión de las larvas se colocaron aproximadamente 500 larvas en los tubos tipo eppendorf de 2mL, posteriormente se le agregó 1 mL de la solución del extracto y se mantuvo en agitación durante 10 min en una mesa agitadora (Shaker). Al concluir el período de inmersión, el contenido de los tubos tipo eppendorf de 2 mL se depositó en los paquetes de papel filtro poro fino previamente etiquetados, sellándose los bordes con los agarrapapeles para evitar la fuga de las larvas. Una vez los sobres sellados, se colocaron en charolas y se introdujeron por 24 h en una incubadora BOD, con una temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa del 80-90%. Transcurridas las 24 h de incubación se realizó la lectura, contabilizando el número de larvas vivas y muertas en los tratados y controles. Para calcular el porcentaje de mortalidad se utilizó la misma fórmula que la Prueba de Paquete de Larvas (Santamaría & Soberanes, 2001).

7.10. Análisis Estadístico

Todos los datos se analizaron para evaluar la suposición de distribución normal y la homogeneidad de la varianza. En la evaluación enzimática se utilizó la prueba t de Student para los datos normales y la U de Man-Whitney para los que no. En los bioensayos se utilizó un ANOVA y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. Los datos de la población de Nuevo León no cumplieron con los supuestos de normalidad, por lo que se analizaron mediante la prueba paramétrica antes mencionada (Mena-Blanca 2017). Para todas las pruebas se consideró el valor de $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo.

8. RESULTADOS

8.1. Rendimiento de los extractos

Los extractos metanólicos se obtuvieron mediante el equipo Soxhlet, obteniendo diferentes particiones. En la Tabla 6 se observan los diferentes rendimientos obtenidos a partir de 460 g de material biológico de las hojas de *A. ludoviciana* y *C. boissieri*, y las semillas de *L. chinensis*.

Tabla 2. Rendimientos obtenidos a partir de 460 g de material biológico para cada planta.

Planta	Extracto	g de la planta	g de extracto
<i>A. ludoviciana</i>	Hexánico	460 g	5.54 g
	Clorofórmico	---	7.94 g
	Metanólico	---	8.94 g
<i>C. boissieri</i>	Hexánico	460 g	4.15 g
	Clorofórmico	---	5.96 g
	Metanólico	---	8.23 g
<i>L. chinensis</i>	Hexánico	460 g	4.15 g
	Clorofórmico	---	8.96 g
	Metanólico	---	10.23 g

8.2. Identificación parcial de los compuestos en los extractos

Los resultados de la cromatografía en capa fina, junto con pruebas coloridas para la determinación parcial de los grupos funcionales en los extractos metanólicos de las plantas utilizadas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Caracterización fitoquímica de extractos metanólicos

Prueba	<i>L. chinensis</i>	<i>A. ludoviciana</i>	<i>C. boissieri</i>
Esteroles y triterpenos	+	+	+
Sesquiterpenlactonas	+	+	-
Coumarinas	-	+	-
Saponinas	-	-	-
Flavonoides	+	+	+
Taninos vegetales	+	-	-
Carbohidratos	+	+	+
Alcaloides	-	-	-

(+) presencia y (-) ausencia

8.3. Actividad enzimática de las poblaciones

La actividad de las esterasas: Acetilcolinesterasa (AChE), Carboxilesterasa (CaE), Fosfatasa Alcalina (ALP) y Glutación-S-Transferasa (GST), fueron significativamente mayor ($p \leq 0.05$) en la población de larvas del estado de Ver., que la del estado de N.L. (Figura 10).

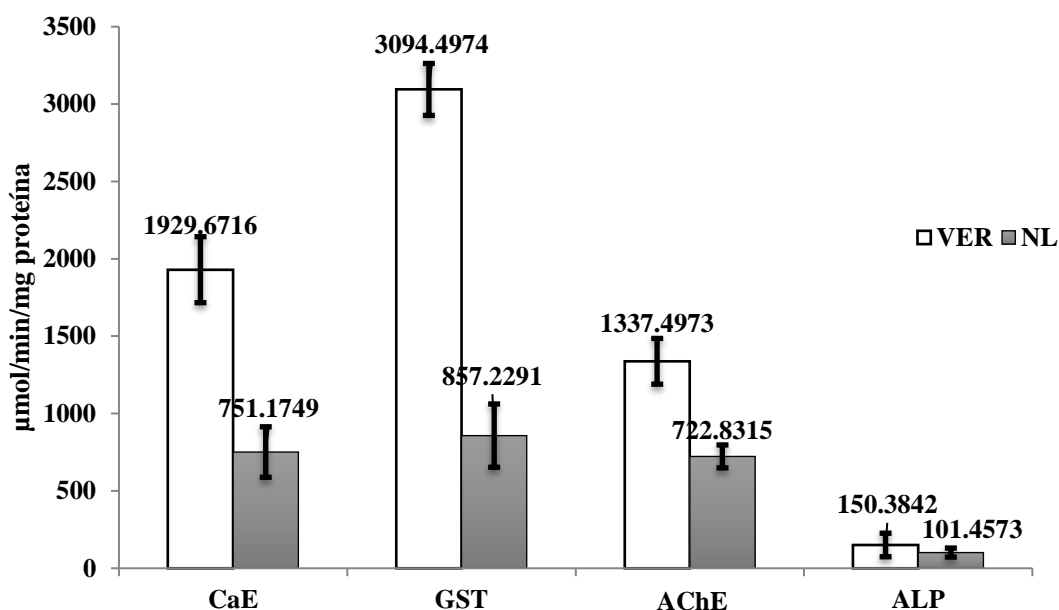


Figura 10: Actividad enzimática promedio de la AChE, GST, CaE, y ALP en poblaciones de larvas de *R. (B.) microplus* provenientes de los estados de VER. y NL.

8.4 Bioensayos

Los resultados de la mortalidad de las larvas de las poblaciones de *R. (B.) microplus* se observan en la Tabla 4, para los acaricidas sintéticos, la cipermetrina presentó muy baja mortalidad en la población de Ver. (6.03%) y una mortalidad elevada en la población de N.L. (97.38%), coumafós presentó mortalidades del 100% en ambas poblaciones y la asociación clorpirifós + permetrina presentó elevadas mortalidades elevadas para ambas poblaciones (Ver. =97.5%) (N.L.=100%), el control (AO+Tc) presentó una mortalidad por debajo del 5%, observándose diferencia significativa con todos los tratamientos, excepto con la cipermetrina en la población de Ver.

En los resultados de los extractos metanólicos (Tabla 4), se observaron mortalidades muy similares en ambas poblaciones, con mortalidades mayores con

respecto al control, solo *C. boissieri* en las concentraciones de 50 y 100 mg/mL, no presentó diferencia estadística significativa con respecto a los controles.

Los extractos de *L. chinensis* en las poblaciones de Ver. y N.L. presentaron mortalidades similares, la concentración de 150 mg/mL en la población de Ver. (99.73%), no presentó diferencia estadística significativa comparándolo con el coumafós, contrario a la población de N.L., donde presentó una mortalidad del 98.44%, mostrándose diferencia con el coumafós y la asociación clorpirifós + permetrina.

Los extractos de *A. ludoviciana* presentaron una mortalidad moderada, directamente proporcional a la concentración, con una mortalidad cercana al 90% en la concentración de 150 mg/ml.

Tabla 4. Mortalidad de los acaricidas sintéticos y extractos de las plantas en las dos poblaciones.

Tratamientos	Veracruz	Nuevo León
Cipermetrina	6.03 (1.69) ^{gh}	97.38 (0.99) ^{abc}
Coumafós	100 (0) ^a	100 (0) ^a
Clorpirifós + Permetrina	97.50 (0.57) ^{ab}	100 (0) ^a
Control (AO+Tc)	2.00 (0.88) ^h	2.00 (0.88) ^g
<i>Litchi chinensis</i>		
50	85.09 (0.68) ^{de}	88.87 (0.00) ^{cd}
100	94.23 (1.13) ^{bc}	91.58 (4.91) ^{cd}
150	99.73 (0.38) ^a	98.44 (0.56) ^{bc}
Control Met 60%	4.57 (1.66) ^h	4.57 (1.66) ^{fg}
<i>Cordia boissieri</i>		
50	3.79 (1.01) ^h	13.74 (1.22) ^f
100	4.87 (0.24) ^h	16.08 (1.62) ^f
150	10.33 (1.53) ^g	33.04 (10.07) ^e
Control Met 60%	4.57 (1.66) ^h	4.57 (1.66) ^{fg}
<i>Artemisia ludoviciana</i>		
50	73.86 (3.00) ^f	87.31 (0.74) ^d
100	82.20 (2.06) ^e	86.85 (0.07) ^d
150	89.21 (2.26) ^{cd}	89.39 (0.79) ^{cd}
Control Met 60%	4.57 (1.66) ^h	4.57 (1.66) ^{fg}

Las letras correspondientes comunes a-h en una columna dada no indican diferencias significativas ($p > 0.05$).

9. DISCUSIÓN

Las plantas han sido utilizadas durante muchos años en la medicina tradicional, debido a sus efectos farmacológicos (Prieto-Gonzales et al., 2004). En las últimas décadas, extractos de plantas han sido aprovechados por sus actividades antimicrobianas (Sharma et al., 2017) y acaricidas sobre las garrapatas (Adenubi et al., 2016). Respecto a la caracterización parcial de los extractos metanólicos (Tabla 3), se observa que *C. boissieri* presentó: esteroides, triterpenos y flavonoides, lo que concuerda con lo reportado por Ferreira et al. (2015), donde mencionan que distintas plantas del género *Cordia*, presentan estos metabolitos secundarios, por otro lado, se ha reportado que distintos extractos de esta planta presentan: actividad antibacteriana, antifúngica y antioxidante (Salazar-Aranda et al., 2011; Viveros-Valdez et al., 2016). Los extractos de *A. ludoviciana* presentaron: esteroides, triterpenos, sesquiterpenlactonas, coumarinas y flavonoides. Esta planta pertenece a la familia Asterácea, la cual cuenta con una diversidad de especies con actividades toxicológicas, con estos metabolitos secundarios (Adenubi et al., 2016). Un ejemplo, es el caso del extracto metanólico de *Artemisia absinthium* en una concentración de 200 mg/mL, presentando 100% de mortalidad en adultas de la especie de garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Godara et al., 2014). El extracto de semilla de *L. chinensis* presentó: esteroides, triterpenos, sesquiterpenlactonas, flavonoides y taninos, similar a lo descrito por Ibrahim & Mohamed (2015), donde extractos de *L. chinensis* presentan estos metabolitos secundarios, con usos etnofarmacológicos como son: la actividad antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, antidiabética, hepatoprotectora, inmunomoduladora y antitrombótica (Yang et al., 2012; Lin et al., 2015; Wen et al., 2014; Nimmanpipug et al., 2009; Yamanishi et al., 2014; Chang et al., 2013; Bhoopat et al., 2011; Jing et al., 2014; Sung et al., 2012). En general, los extractos metanólicos de las plantas usadas en este estudio, presentan algunos metabolitos secundarios diferentes, responsables de la actividad acaricida en diferentes proporciones (Tabla 4), con variaciones en cuanto a la mortalidad y a los parámetros reproductivos de la garrapata (Adenubi et al., 2016), ya que estos metabolitos presentes en las plantas, actúan de diferentes maneras, por ejemplo: contrarrestando las hormonas reguladoras del crecimiento, inhibiendo la acetilcolinesterasa y la formación de quitina (Katoch et al., 2007; Chagas et al., 2012).

La sobreexpresión de esterasas y glutatión S-transferasas, está asociada con la desintoxicación metabólica de los pesticidas (Bellgard et al., 2012). En las garrapatas, estas enzimas se han visto implicadas en la resistencia, a través del mecanismo de desintoxicación metabólica (Bellgard et al., 2012; Nandi et al., 2015; Ghosh et al., 2015; Gupta et al., 2016; Ghosh et al., 2017; Chigure et al., 2018; Fular et al., 2018). En cuanto a las esterasas, las CaE catalizan la hidrólisis de los ésteres y se clasifican en la superfamilia de la serina hidrolasa, involucradas en la desintoxicación y jugando un papel fisiológico importante en el metabolismo de los lípidos (Ran et al., 2009). La AChE es una enzima clave en el sistema nervioso de los animales, hidrolizando el neurotransmisor acetilcolina (Temeyer et al., 2013). Los estudios sobre cepas de *R. (B.) microplus* resistentes a los acaricidas, han demostrado que las esterasas, en particular la CaE y las AChE, están asociadas con la resistencia, lo que implica un aumento de la desintoxicación metabólica y la insensibilidad al sitio de acción (Li et al., 2005). Por otro lado, Baxter y Barker (2002), demostraron la relación entre la resistencia a los organofosforados (OP) y la alta actividad de AChE en poblaciones de garrapatas australianas. Así mismo, se han detectado mutaciones puntuales de genes CaE y AChE en cepas resistentes de esta especie, que se asocian con resistencia (Hernández et al., 2002). De igual forma en *R. (B.) microplus*, se detectaron tres esterasas, caracterizadas como CaE, basadas en la inhibición enzimática y se mostró una alta actividad de estas enzimas en una cepa resistente (Villarino et al. 2003). En cuanto a los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad enzimática de las poblaciones (Figura 10), observamos que las esterasas (CaE y AChE), presentaron diferencia significativa entre las dos poblaciones, siendo la población de Ver. la que presentó mayor actividad enzimática. Un estudio realizado por Fular A. (2020), reporta valores de diferentes actividades enzimáticas para la CaE, AChE y GTS, en una cepa susceptible y una resistente de *R. (B.) microplus*, tomando en cuenta estos valores, observamos que la población de Ver. presentó valores de actividad enzimática de CaE similares a la de la cepa resistente y la población de N.L. a la cepa susceptible. Así mismo, se sabe que la actividad de la CaE, presenta una relación con la presencia de la resistencia a organofosforados y piretroides, ya que juega un papel importante en la detoxificación metabólica sobre los piretroides, esto concuerda con los resultados obtenidos en los bioensayos (Tabla 4), donde observó una alta actividad de la enzima en

la población de Ver. y una baja mortalidad de la garrapata. Respecto a la AChE, se obtuvo una actividad enzimática en la población de Ver. mayor que para la población de NL, sin embargo, no se mostró una baja mortalidad ante el organofosforado, esto podría deberse a que las larvas presenten resistencia por penetración a los OP y esta les permite inhibir o retardar la penetración del químico, a través de su exoesqueleto (Alonso-Díaz et al., 2010). Las GST son enzimas que catalizan la conjugación entre el glutatión y varias moléculas, juegan el papel más importante en el mecanismo de desintoxicación celular de los compuestos xenobióticos y endógenos (Agianian et al., 2003). La exposición química en los artrópodos, en este caso en las garrapatas, es un evento clásico que selecciona la resistencia a los pesticidas, relacionado a una alta actividad de la GST (Ketterman et al., 2001; Wei et al., 2001; Freitas et al., 2007). En los resultados obtenidos de la GST (Figura 10), se mostró un valor elevado en la población de Ver., similar al presentado en el estudio de Fular A. (2020), sin embargo, los valores en la población de N.L. se encuentran por debajo del valor de la cepa resistente y superior a la susceptible, en la población de Ver. se observan los valores superiores a los de la cepa resistente presentados por Fular A. (2020), suponiendo que la baja efectividad de los piretroides en la población de Ver. (Tabla 4), se debe al aumento significativo de la actividad enzimática de la GST. La Fosfatasa alcalina (ALP) es una enzima digestiva involucrada en los mecanismos de adsorción y transporte a través de la hidrólisis de grupos fosfato (Moss, 1992). El aumento en la actividad de la ALP se ha asociado con los mecanismos de desintoxicación de los compuestos de fósforo, particularmente en los insectos que se vuelven resistentes a estos pesticidas (Aguilera, 2015). La ALP también participa en el transporte de glucosa y ácidos grasos a través de la membrana del epitelio del intestino medio, como se ha observado en *Bombyx mori* (Vlahovic et al., 2009). En los insectos, se han realizado pocos estudios sobre el uso de la ALP como biomarcador, sin embargo, Bounias et al. (1996) observaron un aumento en la actividad de ALP después del tratamiento con cobre en la abeja melífera, así mismo, Badiou-Bénéteau et al. (2012) evaluaron la ALP como biomarcador, para indicar exposición de la abeja *Apis mellifera* a pesticidas de la familia neonicotinoide, observando modificación en la actividad enzimática en las abejas expuestas. En garrapatas, no existen reportes de la evaluación de la ALP asociada a resistencia a

acaricidas, sin embargo, se observó la presencia de actividad de dicha enzima, siendo mayor en la población de Ver., mostrando diferencia significativa con respecto a de N.L.

En los resultados de la mortalidad de las poblaciones con los acaricidas sintéticos (Tabla 4), se puede apreciar una muy baja eficacia de la cipermetrina en la población de Ver. y ligeramente baja en la población de N.L., encontrándose ambas por debajo de lo descrito en la NOM-006-ZOO-1993, la cual nos dice que la eficacia de los acaricidas debe ser mayor o igual al 98%, lo que concuerda con lo descrito por Fernández-Salas et al. (2012), en donde se reporta la presencia de cepas resistentes a la cipermetrina con una mortalidad del 3% en dosis discriminantes en cuatro municipios del estado de Ver. Por otro lado, en el estado de N.L., Esparza (2015) demostró la presencia de cepas ligeramente resistentes a la cipermetrina, concordando así con nuestro resultado. Esto demuestra el aumento de la resistencia a los piretroides en los últimos años. El coumafós y la asociación clorpirifós-permetrina, presentaron alta eficacia en la población de N.L. (Tabla 4), existen pocos trabajos del diagnóstico de la resistencia en el estado de N.L., sin embargo, Esparza (2015) nos confirma la presencia de cepas susceptibles en el estado de N.L. Por otro lado, en los estudios realizados por el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) entre los años 2015 y 2017, no indican en el estado de N.L. una presencia de resistencia al organofosforado y a la asociación piretroide-organofosforado (Neri, 2018), ya que se carece de datos, debido a que la mayoría de los productores del estado, no envían muestras para el diagnóstico de resistencia, aún y cuando se tienen problemas de resistencia importantes. En la población de Ver., la eficacia del coumafós fue del 100% de mortalidad, observando que esta población, actualmente no está presionada por este acaricida, por lo tanto, la efectividad del producto aun es considerable para su aplicación. Por otro lado, la asociación clorpirifós-permetrina fue más baja, no alcanzando lo establecido por la NOM-006-ZOO-1993, sin embargo, Rodríguez-Vivas et al. (2011), nos dicen, que si obtenemos una mortalidad del 80-99%, el acaricida podría utilizarse por seis meses más y posteriormente dejar de utilizarlo al menos por dos años, utilizando mientras, otras familias de acaricidas con rotación anual, pero si la mortalidad obtenida es muy baja ($< 60\%$), ese producto ya no podrá ser utilizado más, ya que la resistencia de *R. (B.) microplus* hacia los organofosforados y piretroides, está caracterizada genéticamente por dominancia incompleta, por lo que es posible encontrar

poblaciones de garrapatas resistentes a estos acaricidas años después de haberse dejado de usar. Nuestros resultados en la población de N.L., con respecto a la asociación, fueron similares a los obtenidos por Fernández-Salas et al. (2012), en donde mencionan la presencia de cepas multirresistentes en cuatro municipios de Ver., además Rodríguez-Vivas et al. (2007), reportan la presencia de cepas resistentes a las distintas asociaciones de acaricidas sintéticos en cuatro estados de la República Mexicana, entre ellos Ver. Cabe mencionar, que las poblaciones de garrapatas de *R. (B.) microplus* en este estado, se encuentran en su mayoría presionadas con estos acaricidas, por lo tanto, normalmente, obtendremos menor eficacia de estos, lo que se debe también, a que la eficacia de los acaricidas varía según las regiones, dependiendo principalmente de factores como; nichos ecológicos, el manejo del ganado y el uso de los acaricidas (Jonsson, 1997), esto demuestra así, que los factores ambientales y operacionales (Denholm et al., 1992), han propiciado el aumento de la resistencia en el estado de Ver. Además, esta variación de la eficacia de los acaricidas se atribuye a que las garrapatas presentan una respuesta toxicológica diferente, debido a la situación de la resistencia en cada población (Guerrero et al., 2001; Foil et al., 2004).

Las tres concentraciones (50, 100 y 150 mg/mL) de los extractos metanólicos de *C. boissieri* probadas en ambas poblaciones (Tabla 4), mostraron actividad acaricida. Sin embargo, la eficacia en general fue muy baja, siendo la más alta del 33.04% en la concentración de 150 mg/ml en la población de N.L., esta actividad acaricida, puede deberse, a que el extracto actúe como inhibidor de la AChE, que es la enzima blanco de los organofosforados, que, en poblaciones de garrapatas resistentes, esta se encuentra alterada produciéndose en exceso, como podría ser el caso de la población de Ver. donde el extracto presentó menor eficacia. Dicho esto, ya que Marinia et al. (2015), presentaron un estudio de tres especies del género *Cordia* originarias de Panamá, en el cual se demostró la capacidad *in vitro* de inhibir la AChE, siendo la especie *Cordia megalantha*, la que presentó mayor actividad, sin embargo, estudios son necesarios para asegurar este mecanismo de acción con esta especie.

Los porcentajes de mortalidad del extracto de *A. ludoviciana* (Tabla 4) en las concentraciones de 50, 100 y 150 mg/mL en ambas poblaciones, presentaron similitudes, observándose ligeramente más elevados en la población de N.L. que en la de Ver., siendo

la mortalidad más alta del 89.39 % en la concentración de 150 mg/mL. Godara et al. (2014), describen que el extracto metanólico de la especie *Artemisia absinthium* en una concentración de 200 mg/mL, presenta 100% de mortalidad en la especie de garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. Con esto se puede considerar, que el aumento de la concentración del extracto de *A. ludoviciana*, nos podría dar como resultado una mayor mortalidad.

Las concentraciones de 50, 100 y 150 mg/mL del extracto de la semilla de *L. chinensis* (Tabla 4) en ambas poblaciones, presentaron las mortalidades más elevadas en la concentración de 150 mg/mL, siendo del 99.44% en la población de N.L. y del 99.73% en la población de Ver. Comparándolo con los extractos de *A. ludoviciana*, observamos mayor mortalidad a menor concentración. Estos resultados se pueden comparar con extractos de plantas que actualmente figuran en productos comerciales como son: *Azadirachta indica* en donde 8.68 mg/mL causa 90% de efectividad (Avinash et al., 2017), *Cymbopogon citratus* en una concentración de 125 mg/mL, causando 98.78% de efectividad (Chungsamarnyart & Jiwajinda, 1992), *Thymus vulgaris* en una concentración de 20 mg/mL, causando 98.1% de efectividad (Monteiro et al., 2009). Los resultados en este estudio, no se observan tan alejados de lo reportado para la planta *C. citratus*, lo cual, nos lleva a trabajar en el proceso de obtención y purificación del extracto, para obtener una mayor efectividad, de igual forma tener en cuenta que las plantas de una misma especie, pueden variar en la cantidad de componentes químicos, debido a sus variaciones inter específicas y otros factores como son: la estacionalidad, ritmo circadiano, desarrollo, temperatura, radiación ultravioleta, disponibilidad de agua, altitud y contaminación atmosférica, entre otros, cambiando la tasa de producción de los metabolitos secundarios presentando, una efectividad diferente (Gobbo-Neto, et al., 2007). Cabe mencionar que debido a su alta actividad acaricida mostrada en este estudio, el extracto metanólico de la semilla de *L. chinensis*, puede ser utilizado como una fuente alternativa para controlar las infestaciones de *R. (B.) microplus*, retrasando el desarrollo de la resistencia a los acaricidas; por otro lado, este es solo el efecto acaricida *in vitro*; por lo tanto, es necesario realizar estudios adicionales *in vivo* (Martins & González, 2007), con el fin de ver si la concentración mínima acaricida probada en este estudio, puede causar la misma actividad, debido a las dificultades relacionadas con las condiciones ambientales externas (Mulla, 1999).

10. CONCLUSIONES

- La metodología de obtención mediante el equipo Soxhlet, permitió obtener extractos de las plantas utilizadas, siendo el extracto de semilla de *L. chinensis*, el que presentó un mayor rendimiento de extracción que los extractos de las hojas de *A. ludoviciana* y *C. boissieri*.
- En la caracterización parcial, el extracto de *C. boissieri*, presentó menos grupos de compuestos y *L. chinensis*, se diferenció por la presencia de taninos y *A. ludoviciana* por la presencia de coumarinas, los tres extractos presentaron esteroides y triterpenos y *L. chinensis* y *A. ludoviciana* presentaron Sesquiterpenlactonas.
- Las enzimas: AChE, CaE, GST y ALP, mostraron diferencia significativa en las dos poblaciones, siendo la población de Veracruz, la que presentó mayor actividad enzimática ($p \leq 0.05$) y una menor eficacia de los acaricidas.
- La cipermetrina, no puede ser utilizada en ninguna de las poblaciones, el coumafós puede ser utilizado en las dos poblaciones y la asociación solo en la población de Nuevo León.
- Los extractos metanólicos, se comportaron de manera similar en las dos poblaciones respecto a la mortalidad, siendo el extracto de *C. boissieri*, el que presentó las mortalidades más bajas.
- El extracto de *L. chinensis* en la concentración de 150 mg/mL, presentó una mortalidad mayor ($p \leq 0.05$) que la cipermetrina en las dos poblaciones y que la asociación en la población de Veracruz.
- El extracto metanólico de *L. chinensis*, puede ser utilizado como posible alternativa para el control de la garrapata *R. (B.) microplus*, sin embargo, estudios previos de caracterización, toxicidad y formulación son necesarios.

- El extracto metanólico de *A. ludoviciana*, probablemente presente un mayor efecto acaricida en una concentración de 200 mg/mL, sin embargo, su posible aplicación estaría limitada por su rendimiento de extracción.

11. LITERATURA CONSULTADA

- Acevedo P. 2017. ITIS [Online] Disponible en: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=500383#null
- Adenubi O.T., Fasina F.O., McGaw L.J., Eloff J.N., & Naidoo V. 2016. Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: A review South African Journal of Botany. 105; 178–193.
- Agianian, B., Tucker, P.A., Schouten, A., Leonard, K., Bullard, B., Gros, P., 2003. Structure of a *Drosophila sigma* class glutathione S-transferase reveals a novel active site topography suited for lipid peroxidation products. J. Mol. Biol. 326, 151–165.
- Aguilera C., Cruz J., Mendoza R. 2015. Physiological response of alligator gar juveniles (*Atractosteus spatula*) exposed to sub-lethal doses of pollutants. Fish Physiol Biochem. 41, 1015–1027.
- Alonso-Díaz M., Rodríguez-Vivas R., Fragoso-Sánchez H., Rosario-Cruz R. 2006. Ixodicide resistance of the *Boophilus microplus* tick to ixodicides. Arch. Med. Vet. 2, 105-113.
- Alanís F.G.J., Cano-Cano, G. y Rovalo-Merino, M. 1996. Vegetación y flora de Nuevo León. Una guía botánico-ecológica. Editorial CEMEX. México. Pp 25-66.
- Alves, J.A., de Oliveira, L.L.C., Nunes, C.A., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2011. Chemical, physical-chemical, and sensory characteristics of lychee (*Litchi chinensis* Sonn) wines. Journal of Food Science 76; 330-336.
- Andreotti R., Koller W. 2016. Carrapatos: protocolos e técnicas. 1ª ed. Brasília, D. F: Embrapa gado de corte. 217 p.
- Aragon, HB; Fonseca, F. 1962. Notas de ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 59(02); 115-129.
- Arceo G.N, 2016. Synergistic and antagonistic action of fatty acids, sulphides and stilbene against acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* ticks” Veterinary Parasitology, 228, pp. 121-125.

- Avinash B., Supraja N., Santhi P. 2017. Evaluation of acaricidal activity of *Azadirachta indica* extracts against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and its GC-MS análisis. International Journal of Science, Environment and Technology, 6; 980–992.
- Badiou-Beneteau A., Carvalho S., Brunet J., Carvalho G., Bulete A., Giroud A., Belzunces L. 2012. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honeybee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. Ecotoxicology and Environmental Safety. 82, 22–31.
- Baxter GD, Barker SC. 1998. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, *Boophilus microplus*: characterization and role in organophosphate resistance. Insect Biochem Mol Biol 28:581–589.
- Baxter GD, Barker SC. 2002. Analysis of the sequence and expression of a second putative acetylcholinesterase cDNA from organophosphate-susceptible and resistant cattle ticks. Insect Biochem Mol Biol. 32, 815–820.
- Bellgard, M.I., Moolhuijzen, P.M., Guerrero, F.D., Schibeci, D., Rodriguez-Valle, M., Peterson, D.G., 2012. Cattle tick base: an integrated internet-based bioinformatics resource for *R. (B.) microplus*. Int. J. Parasitol. 42, 161–169.
- Benavides OE, Romero NA, Rodríguez BJ. 2000. Situación actual de la resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a acaricidas en Colombia. Carta Fedegan 61; 14–23.
- Bhat, R.S., Al-Daihan, S., 2014. Antimicrobial activity of *Litchi chinensis* and *Nephelium lappaceum* aqueous seed extracts against some pathogenic bacterial strains. Journal of King Saud University-Science 26, 79–82.
- Bhoopat, L., Srichairatanakool, S., Kanjanapothi, D., Taesotikul, T., Thananchai, H., Bhoopat, T., 2011. Hepatoprotective effects of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.): A combination of antioxidant and anti-apoptotic activities. Journal of Ethnopharmacology 136, 55–66.
- Bisset, J. A. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la Resistencia. Rev. Cubana Med. Trop. 54(3): 202–219.

- Borges, LMF; Sousa, LAD de.; Barbosa, C. 2011. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária Jaboticabal*, v. 20, n. 02, p. 89-96.
- Bounias, M., Kruk, I., Nectoux, M., Popeskovic, D., 1996. Toxicology of cupric salts on honeybees. V. gluconate and sulfate action on gut alkaline and acid phosphatases. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 67–76.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p. 248-254.
- Casida JE. y Durkin, K.A. 2013. Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58: 99–117.
- Canestrini G. 1888. Intorno da alcuni Acari ed Opilonidi dell'America. *Atti Società Veneto-Trentina Scienze Naturali Padova Residente Padua.* 11: 100–109.
- Campos R.N.S, Bacci L, Araújo A.P.A, Blank A.F, Arrigoni-Blank M.F, Santos G.R.A, Roner M.N.B. 2012. Óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*. *Revista Archivos de Zootecnia.* 61, 67-78.
- Castellanos H. J. 2018. Situacional actual y perspectivas de la campaña nacional contra la garrapata *Rhipicephalus* spp. *Memorias del curso de capacitación para la inspección de ganado y control de la garrapata para la movilización nacional y exportación 19, 20 y 21 de septiembre de 2018, Piedras Negras, Coahuila, México.* p. 1-14.
- Castro K.N. de. C, Lima D.F, Vasconcelos L.C, Magalhães J.A, Costa J.V, Santos R.C.D. 2011. Ação de óleos e extratos vegetais no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus in vitro*. *Cadernos de Agroecologia*, 06(02), 1-6.
- Center for Food Security & Public Health (CFSPH). 2007. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Garrapata del ganado del sur, garrapata del ganado bovino. College of Veterinary Medicine, Iowa State University, p. 1-6
- Chagas ACS, Leite RC, Furlong J, Prates HT, Passos WM. 2003. Sensibility of *Boophilus microplus* tick to solvents. *Cienc Rural*; 33(1): 109-114.

- Chagas, A.C.S., de Barros, L.D., Continguiaba, F., Furlan, M., Giglioti, R., Oliveira, M.C.S., Bizzo, H.R., 2012. In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. (Acari: Ixodidae). Parasitology Research 110, 295–303.
- Chang, Y., Yang, D., Chiu, C., Lin, Y., Chen, J., Chen, Y., 2013. Antioxidative and anti-inflammatory effects of polyphenol-rich litchi (*Litchi chinensis* Sonn.)-flower-water extract on livers of high-fat-diet fed hamsters. Journal of Functional Foods. 5; 44-52.
- Chapman, R.F. 2013. The insects. Structure and Function. 5th. Edition. Cambridge University Press. p. 109-114.
- Chen, A.C., He, H., Davey, R.B., 2007. Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. Veterinary Parasitology 148, 379-383.
- Chen, Y.B., Wu, K.S., Gu, Y., Chen, J.Z., 2007. Research progress in the chemical constituents and pharmacological effects of lychee seeds. Chinese Journal of Infection Traditional Chinese medicine 14, 97-98.
- Chigure, G.M., Sharma, A.K., Kumar, S., Fular, A., Sagar, S.V., Nagar, G., Upadhaya, D., Saravanan, B.C., Kumar, R., Ghosh, S., 2018. Role of metabolic enzymes in conferring resistance to synthetic pyrethroids, organophosphates, and phenylpyrazole compounds in *Rhipicephalus microplus*. Int. J. Acarol. 44, 28–34.
- Chungsamarnyart, N., Jiwajinda, S., 1992. Acaricidal activity of volatile oil from lemon and citronella grasses on tropical cattle ticks. Kasetsart Journal: Natural Science Supplement. 26; 46–51.
- Cloyd, R. 2004. Natural indeed: Are natural insecticide safer and better than conventional insecticides? Illinois Pesticide Review, Vol. 17, p. 1-3.
- Dantas-Torres F., Fernandez T., Muñoz-Lealb S., Castilho V., Barros-Battestie D. 2019. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. Ticks and Tick-borne Diseases. 10; 101-126.
- Denholm I, Rowland MW. 1992. Tactics for managing pesticide resistance in Arthropods: Theory and practice. Annual Review of Entomology. 37, 91-112.

- Drummond RO, Ernest SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH. 1973. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus* Laboratory tests of insecticides. J. Econ. Entomol, v. 66 n. 01, p. 130-133.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. 1961. A new and rapid calorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology. 7, 88-95.
- Esparza J. & Esparza E. 2015. Susceptibility of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) to seven ixodicides in Nuevo Leon, Mexico. Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias. 4(8); 1-10.
- Estrada PA., Bouattour A, Camicas J.L, Guglielmone, A, Horak I, Jongejan F, Latif A, Pegram R, Walker, A.R. 2006. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. Experimental and Applied Acarology, 38(02-03) 219-235.
- Estrada-Soto S., Sanchez RA., Navarrete VG., Castillo EP., Villalobos MR. & Ibarra BM. 2012 Relaxant effects of *Artemisia ludoviciana* on isolated rat smooth muscle tissues. Journal of Ethnopharmacology. 139, 513-518.
- Feuillet C. 2018; IT IS. [Online] Disponible en: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=31744#null
- Fernández-Salas A., Rodríguez-Vivas R., Alonso-Díaz M. 2012. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. Veterinary Parasitology. 183: 338– 342
- Ferreira E., Ferreira, Do Nascimento M, Alencar V, Melo H, Martins J. 2015. The genus *Cordia*: botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects Revista Brasileira de Farmacognosia. 25; 542–552
- Food and Agriculture Organization of United Nation (FAO). 1971. Recommended methods for detection and measurement of resistance of agricultural pest to pesticides. Tentative method for larvae of cattle ticks *Boophilus spp.* Method No. 7. FAO. Protection Bulletin. 19, 13-18.

- Food and Agriculture Organization of United Nation (FAO). 1979. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. FAO Plant Protection Bulletin. 27: 29-32.
- Food and Agriculture Organization of United Nation (FAO). 1984. Tick- and tick-borne diseases control a practical field manual. FAO. Vol. 1. pp.1-10.
- Food and Agriculture Organization of United Nation (FAO). 1999. Standardization of diagnostic test. Sub-group 2. Adult Immersion test (AIT). The FAO working group and FAO/Industry contact group on parasite resistance. Embrapa-Gado De Leite. Juis de For a M.G. Brazil. pp. 8-12.
- Food and Agriculture Organization of United Nation (FAO). 2004. Resistance management and integrated parasite control in ruminants. Guidelines, Animal production and health division. pp 25-77.
- Foil L.D, Coleman P, Eisler M, Fragoso-Sanchez, H, Garcia-Vazquez Z, Guerreiro F.D, Jonsson N.N, Langstaff I.G, Li A.Y.; Machila N, Miller R.J, Morton J, Pruett J. H, Torr S. 2004. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tickborne diseases. Veterinary Parasitology. 125(01-02), 163-181.
- Fournier D., Mutero A. 1997. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides, Comp. Biochem. Physiol. 108:19–31.
- Fragoso S H, Soberanes C.N. 2001. Control de la resistencia a los ixodicidas a la luz de los conocimientos actuales. Memorias de XXV Congreso Nacional de Buiatria. Veracruz, Veracruz, México. Asociación Mexicana de Médicos especialistas en Bovinos, A.C. p. 40-48.
- Freitas D.R.J. Rosa R., Moraes J., Campos E., Logullo C., Da Silva I., Masuda A. 2007. Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) Comparative Biochemistry and Physiology. 146, 688–694
- Furlong, J. 1998. Poder infestante de larvas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em pastagem de *Melinis minutiflora*, *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria mutica*. Ciência Rural Santa María. 28: 635-640.

- Fular, A., Sharma, A.K., Kumar, S., Nagar, G., Chigure, G., Ray, D.D., Ghosh, S., 2018. Establishment of a multi-acaricide resistant reference tick strain (IVRI-V) of *Rhipicephalus microplus*. Ticks Tick Borne Dis. 9, 1184–1191.
- Fular A., Gupta S., Kumar A., Kumar S., Upadhaya D., Shakya M., Nagar G., Ghosh S. 2020. Standardization of tick specific biochemical tools for estimation of esterases, monooxygenases and glutathione S-transferase for characterization of acaricide resistance. Pesticide Biochemistry and Physiology. 105; 178–193.
- George, John E.; Pound, Mathews.; Davey, Ronald B. 2008. Acaricides for controlling ticks on cattle and the problem of acaricide resistance. In: Bowman, Alan S.; Nuttall, Pat A. Ticks: Biology, Disease and Control. Cambridge, UK: Cambridge University Press. p. 415-416.
- Guerrero, FD; Davey, RB., Miller RJ. 2001. Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology. 38(1) 44-50.
- Gobbo-Neto L, Lopes NP. 2007. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quim Nova; 30(2): 374-381
- Godara, R., Parveen, S., Katoch, R., Yadav, A., Verma, P.K., Katoch, M., Kaur, D., Ganai, A., Raghuvanshi, P., Singh, N.K., 2014. Acaricidal activity of extract of *Artemisia absinthium* against *Rhipicephalus sanguineus* of dogs. Parasitology Research. 113; 747–754.
- Gontier, E., Boussouel, N., Terrasse, C., Jannoyer, M., Ménard, M., Thomasset, B., Bourgaud, F., 2000. *Litchi chinensis* fatty acid diversity: occurrence of the unusual cyclopropanoic fatty acids. Biochemical Society Transactions 28, 578-580.
- González JR. 2009. Importancia de la garrapata *Boophilus spp.* en la exportación de ganado. Simposium internacional: garrapatas, Babesiosis y Anaplasmosis. FMVZ-UAT. Cd Victoria, Tam. México. pp. 30-34.
- Gonzales, JC. 1974. O carrapato do boi: vida, Resistencia e controle. São Paulo: Mestre Jou. 101 p.
- Ghosh S, Kumar R, Nagar G, Kumar S, Sharma AK, Srivastava A, Kumar S, Ajith Kumar KG, Saravanan BC. 2015. Survey of acaricides resistance status of *Rhipicephalus*

- (*Boophilus microplus*) collected from selected places of Bihar, an eastern state of India. Ticks Tick Borne Dis 6: 668–675.
- Ghosh, S., Gupta, S., Kumar, K.A., Sharma, A.K., Kumar, S., Nagar, G., Kumar, R., Paul, S., Fular, A., Chigure, G., Nandi, A., 2017. Characterization and establishment of a reference deltamethrin and cypermethrin resistant tick line (IVRI-IV) of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Pestic. Biochem. Physiol. 138, 66–70.
- Guglielmone, A.A.; Estrada-Peña, A.; Keirans, A.J.; Robbins, R.G. 2004. Las garrapatas (Acari. Ixodida) de la región zoogeográfica neotropical. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina, 142 p
- Guerrero F.D, Davey R.B, Miller R.J. 2001. Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology, 38(01), 44-50.
- Gupta, S., Ajith Kumar, K.G., Sharma, A.K., Nagar, G., Kumar, S., Saravanan, B.C., Gandham, R., Ghosh, S., 2016. Esterase mediated resistance in deltamethrin resistant reference tick colony of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Exp. Appl. Acarol. 69, 239–248.
- Hernandez R, He H, Chen AC. 2002. Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the cattle tick *Boophilus microplus*. Insect Biochem Mol Biol 30, 969–977.
- Hemingway J., Field L. & Vontas. 2002. An overview of insecticide resistance. *Science*. 298: 96-97.
- Hemingway, J. and Ranson, H. 2004. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annu. Rev. Entomol. 45; 371-391.
- Horn, SC. 1983. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. 2.ed. Brasília: Ministério da Agricultura Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. 79 p.
- Hoskins J. 1991. Ixodid and Argasid Ticks, Keys to their identification. Tick-Transmitted Diseases. 91: 185-197.
- Huang TL, Obih PO, Jaiswal R, Hartley WR, Thiyagarajah A. 1997. Evaluation of liver and brain esterases in the spotted gar fish (*Lepisosteus oculatus*) as biomarkers of effect in the lower Mississippi river basin, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58, 688-695.

- Ibrahim RM., & Mohamed GA. 2015. Litchi chinensis: medicinal uses, phytochemistry, and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 14, 97-98.
- Jamroz RC, Guerrero FD, Pruett JH, Oehler DD, Miller RJ. 2000. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strain of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *J Insect Physiol.*46, 685-695.
- Jing, Y., Huang, L., Lv, W., Tong, H., Song, L., Hu, X., Yu, R., 2014. Structural characterization of a novel polysaccharide from pulp tissues of *Litchi chinensis* and its immunomodulatory activity. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 62; 902-911.
- Jiang, G., Lin, S., Wen, L., Jiang, Y., Zhao, M., Chen, F., Prasad, K.N., Duan, X., Yang, B., 2013. Identification of a novel phenolic compound in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp and bioactivity evaluation. *Food Chemistry* 136, 563-568.
- Jiménez MA. 2011. *Herbolaria Mexicana*. Primera Edicion ed. Primera Edicion. Biblioteca Basica de Agricultura. Estado de Mexico, Mexico, pp. 136-138
- Jongejan F, Uilenberg G. 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*. 129(01), 3-14.
- Jonsson, N. N. 1997. Control of cattle ticks (*Boophilus microplus*) on Queensland dairy farms. *Australian Veterinary Journal*. 75: 802–807.
- Katoch, P., Katoch, M., Yadav, A., Srivastava, A.K., 2007. Formulation of herbal ectoparasiticidals. *Compendium of 18th National Congress of Veterinary Parasitology*, September 7–9, Jammu, India, pp. 24–31.
- Ketterman, A.J., Prommeenate, P., Boonchaay, C., Chanama, U., Leetachewa, S., Promtet, N., Prapanthadara, L., 2001. Single amino acid changes outside the active site significantly affect activity of glutathione S-transferases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 65–74.
- Lagunes A. y Villanueva-Jiménez, J.A. 1999. *Toxicología y manejo de insecticidas*. Colegio de Postgraduados. México. pp. 24–31.
- Lee D., Park Y., Brown M.T., Adams E.M. 1999. Altered properties of neuronal sodium channels associated with genetic resistance to pyrethroids. *Mol Pharmacol.* 55:581-593.

- Lee, AJ. Huntley, A. van den Broek, D. Coates y 2002 Isaac RE. Expresión y caracterización de una psoroptes ovis glutatión S-transferasa. *Parasitología Veterinaria*. 105: 49-63.
- Li AY, Pruet JH, Davey RB, George JE. 2005. Toxicological and biochemical characterization of coumaphos resistance in the San Roman strain of *Boophilus microplus* (Acari, Ixodidae). *Pest Biochem Physiol*. 81: 145–153.
- Li AY, Chen AC, Davey RB, Miller RJ, George JE. 2007. Acaricide resistance and synergism between permethrin and amitraz against susceptible and resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Pest Management Science* 63: 882-889.
- Li AY, Davey RB, Miller RJ. 2010. Laboratory evaluation of Verbutin as a synergist of acaricides against larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Economic Entomology* 103(4): 1360-1364.
- Lin, Y., Chang, J., Cheng, S., Wang, C., Jhan, Y., Lo, I., Hsu, Y., Liaw, C., Hwang, C., Chou, C., 2015. New bioactive chromanes from *Litchi chinensis*. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 63; 2472-2478.
- Linss, J.G.B., Brito, L.P. Azambuja G. G., Saori A. A.2014. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasites & Vector*. 7:25
- Lumjuan, N., Stevenson, Prapanthadara, L., Somboon, P., Brophy, P.M., Loftus, B.J., Severson, D.W. y Ranson, H. 2007. The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Journal of Medical Entomology*. 44:283-294.
- Mannervik, B. and Danielson, U. H. 1988. Glutathione transferases – structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 23, 283-337.
- Marinia G., Graikoua K, Zenginb G, Karikasc G, Mahabir P, Chinoua I. 2018. Phytochemical analysis and biological evaluation of three selected Cordia species from Panama. *Industrial Crops & Products*. 120; 84–89
- Martins RM, González FHD. 2007. Uso del aceite de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) (Panicoideae) como acaricida frente a la garrapata *Boophilus microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae). *Rev Bras Pl Med*. 9(4): 1-8.
- Martinez M., (2011). Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against

- the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 108(2), pp. 481-487.
- Menezes, E.A. 2005. Inseticidas Botânicos: Seus Princípios Ativos, Modo de Ação, Modo de Ação e Uso Agrícola. Seropédica RJ: Embrapa Agrobiologia. 54 p.
- Mena-Blanca. 2017. Non-normal data: Is ANOVA still a valid option?. *Psicothema*. 29(4) 552-557.
- Menzel, C., Waite, G., 2005. Litchi and longan: botany, production, and uses. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxford, UK, pp. 24-27.
- Molina, G.M., López, L.A., Becerril, P., Salazar, R., Said, S. y Waksman, N. 2007. Evaluation of the flora of Northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 435-441.
- Moreira, MD. Picanço, MC. Martins, JC.; Campos, MR &; Chediak, M. 2007. Uso de Inseticidas botânicos no controle de pragas In.; Manejo integrado de doenças e pragas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. p. 577-606.
- Monteiro, C.M., Daemon, E., Clemente, M.A., Rosa, L.S., Maturano, R., 2009. Acaricidal efficacy of thymol on engorged nymphs and females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1808) (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. 105, 1093–1097.
- Moss, D.W., 1992. Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin. Chem*. 38, 2486–2492.
- Moyano FJ, Díaz M, Alarcon FJ, Sarasquete MC. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry* v.15, n.02, p. 121-130.
- Miller, R.J., Davey, R.B., White, W.H., George, J.E. 2007. A comparison of three bioassay techniques to determine amitraz susceptibility in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 44: 283-294.
- Mulla MS, Su T. 1999. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *J Am Mosq Control Assoc*. 15(2): 133-152.
- Nandi, A., Jyoti Singh, H., Singh, N.K., 2015. Esterase and glutathione-S-transferase levels associated with synthetic pyrethroid resistance in *Hyalomma anatolicum* and *Rhipicephalus microplus* ticks from Punjab, India. *Exp. Appl. Acarol*. 66, 141–157.

- Neri S. 2018. Situación actual de la resistencia de la garrapata *Boophilus Microplus* hacia los ixodicidas en México. Dirección del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. (CENAPA). Departamento de Ectoparásitos y Dípteros. Curso de capacitación para la inspección de ganado y control de la garrapata (*Boophilus spp.*) para la movilización nacional y exportación 19, 20 y 21 de septiembre de 2018.
- Nimmanpipug, P., Lee, V.S., Wolschann, P., Hannongbua, S., 2009. *Litchi chinensis*-derived terpenoid as anti-HIV-1 protease agent: structural design from molecular dynamics simulations. *Molecular Simulation*. 35; 673-680.
- NOM-006-ZOO-1993. Requisitos de efectividad biológica para los ixodicidas de uso en bovinos y método de prueba. [Online] Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/nom-006-zoo-1993>.
- Núñez JL. 1987. *Boophilus microplus*. La garrapata común del ganado vacuno. Primera edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial hemisferio sur. pp. 34-40.
- Oteo, J. Blanco, J. Ibarra, V. 2001. ¿Podemos prevenir las enfermedades transmitidas por garrapatas? *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 19: 509-513.
- Owis, A. I. 2014. composition of essential oil from flowers of *Cordia boissieri* adc. and revision of the use of sesquiterpenes as taxonomic markers for the genus *Cordia*. *World J. Pharm. Pharm. Sci*. 3, 133–141 (2014).
- Parra MH, Peláez SL, Segura CF, Arcos JC, Londoño A, Díaz E, Vanegas MA. 1999. Manejo integrado de garrapatas en bovinos. Manual para la capacitación en tecnologías agropecuarias; 2:72-77.
- Pereira, AcrI; Oliveira, Jv De.; Junior, Mgcg; Câmara, Cag da. 2008. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (FABR., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. *Ciência e Agrotecnologia*; 32: 717-724.
- Pérez, T. M., Guzmán-Cornejo, C., Montiel-Parra G., Paredes-León, R. y G. Rivas. 2014. Biodiversidad de ácaros en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 399-407.

- Plata R. 1931. Parasitología, Contribuciones Originales. Nota preliminar sobre las Garrapatas de los animales domésticos. en Colombia. Revista de medicina veterinaria. 17: 45-54.
- Prieto-González S, Garrido-Garrido G., González-Lavaut J., Molina-Torres J. 2004. Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 35 (1) 19-36.
- Quiroz RH. 2005. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos. Primera edición. México, DF. Editorial Limusa. pp. 796-802.
- Ran C., Chen Y. & Jin-Jun Wang. 2009. Susceptibility and carboxylesterase activity of five field populations of *Panonychus citri* (Mcgregor) (Acari: Tetranychidae) to four acaricides. International Journal of Acarology. 35, 115–121.
- Ranson H, Claudianos C, Ortellì F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. Science. 298: 179-181.
- Rapisarda, A., Lauk, L. y Ragusa, S. 1997. Micromorphological study on leaves of some *Cordia* (Boraginaceae) species used in traditional medicine. Economic Botany, 1997: 385-391.
- Rajput, Z. Hu, S. Chen, W. Arijó, A. Xiao, C. 2006. Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. J Zhejiang Univ SCIENCE B; 7(11): 9 12-921.
- Rentería JAE, Sevilla ELE. 2015. Susceptibility of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) to seven ixodicides in Nuevo Leon, México. Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias, 04(08), 1-10.
- Roel, AR. 2001. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. Revista Internacional de Desenvolvimento Local, Vol. 01, p. 43-50.
- Riddles P.W, Nolan J. 1987. Prospects for the management of arthropod resistance to pesticides. International Journal for Parasitology. 17(02), 679-687.
- Rodríguez- Vivas RI, Mata Y, Pérez E, Wagner G. 2004. The effect of management factor on the seroprevalence of *Anaplasma marginale* in *Bos Indicus* cattle in the Mexican tropics. Trop Ani Health Prod; 36:135-143.

- Rodríguez-Vivas RI. 2005. "Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas en el sureste de México." CONACYT-SAGARPA 1: 9-11.
- Rodríguez-Vivas R.I. 2006. "Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico" *Veterinary Parasitology*, 336, pp. 335-342.
- Rodríguez-Vivas RI., Torres, A.J.F., Ramírez, C.G.T., Aguilar R.J.A., Aguilar, C.A.J., Ojeda, C.M.M., y Bolio G.M.E. 2011. Manual técnico: Control de parásitos internos y externos que afectan al ganado bovino en Yucatán, México. UADY-CONACYT. Pp. 12-29.
- Rodríguez-Vivas R., Laerte G., Adalberto A., Pérez L., Humberto V., Torres J., Fragoso H., Romero S. 2017. Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. 8(1), 61-74.
- Rodríguez-Vivas RI, Alonso MAD, Rodríguez FA, Fragoso HS, Santamaría VM, Rosario CR. 2006. Prevalence and potential risk factors for organophosphates and pyrethroids resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Vet. Parasitol.* v. 136, n. 03-04, p. 335-42.
- Rodriguez-Vivas R.I. 2013. In vitro and in vivo evaluation of cypermethrin, amitraz, and piperonyl butoxide mixtures for the control of resistant *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 197(1-2), pp. 288-296
- Rosado-Aguilar. J., 2010. Screening of the acaricidal efficacy of phytochemical extracts on the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: ixodidae) by larval immersion test. *Tropical and Subtropical Agroecosystem*, 12, pp. 417-422.
- Rosario-Cruz R., Miranda ME, Garcia VZ, Ortiz EM. 1997. Detection of esterase activity in susceptible and organophosphate resistant strains of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Bull Entomol Res.* 87, 197-202.
- Rodriguez-Vivas R., Trees A., Rosado-Aguilar J., Villegas-Perez S., Hodgkinson J. 2011. Evolution of acaricide resistance: Phenotypic and genotypic changes in field populations of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in response to pyrethroid selection pressure. *International Journal for Parasitology*. 41; 895–903

- Rodríguez-Vivas R., Rivas A, Chowell G., Fragoso S., Rosario C., Garcia Z., Smith S., Williams J., Schwager S. 2007. Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. *Veterinary Parasitology*. 146; 158–169.
- Rosario-Cruz R., F. Guerrero, R. Miller, R. Rodriguez-Vivas, M. Tijerina, D. Dominguez-Garcia, R. Hernandez-Ortiz, A. Cornel, R. McAbee, M. Alonso-Diaz. 2009. Molecular survey of pyrethroid resistance mechanisms in Mexican field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Parasitol. Res.* 105: 1145–1153.
- Rosario-Cruz R, Almazán C, Miller RI, Domínguez-García DI, Hernández-Ortíz R, de la Fuente J. 2009. Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Fron Bios*; 14: 2657-2665.
- Salazar-Aranda R., Pérez-Lopez, L.A., Lopez-Arroyo, J., Alanís-Garza, B.A., Waksman, N., 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from north-east of Mexico. *Evid. Based Complement. Alternat. Med*: 3(6); 1–6.
- Santos T., Klafke G., Pappen F., Quintana L., Biegelmeyer P., & Rosa N. 2013. Comparison of three larval bioassays to evaluate susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to amitraz. *Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal*. 22(4): 495-501.
- Santamaría, V.M., Soberanes, C.N., 2001. Memorias del curso taller sobre diagnóstico de resistencia a ixodicidas en garrapatas *Boophilus microplus*. Del 26 al 28 de septiembre de 2001. Jiutepec, Morelos, México. pp. 1-40.
- Saxena, S., Hajare, S.N., More, V., Kumar, S., Wadhawan, S., Mishra, B.B., Parte, M.N., Gautam, S., Sharma, A., 2011. Antioxidant and radioprotective properties of commercially grown litchi (*Litchi chinensis*) from India. *Food Chemistry* 126, 39-45.
- Seifert, GW; Springell, PH; Tatchell, RJ. 1968. Radioactive studies on the feeding of larvae, nymphs and adults of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology*, 58: 415-430.
- SENASICA. 2015. Distribución y diversidad de garrapata *Boophilus spp.* [Online] Disponible en:

https://www.aphis.usda.gov/import_export/downloads/presentations/Boophilus-tick.pdf

SENASICA. 2016. Situación de la Resistencia de *B. microplus* en México. [Online] Disponible en:

https://www.aphis.usda.gov/import_export/downloads/presentations/sit-of-the-resis-ofbmicro-in-mx.pdf.

Sharma A., Flores-Vallejo R., Cardoso-Taketa A., Villarreal M. 2017. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology. 208, 264–329.

Shaw, R.D., 1966. Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* and assessment of its resistance spectrum. Bull. Entomol. Res. 56, 389-405.

Shultz Leila M; 2018; ITIS. [Online] Disponible en: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=183738#null

Spickett, A.M. 1994. Tick ecology. International Journal for parasitology, 24: 845-849.

Sparks, TC. Lockwood, J.A., Byford, R.L., Graves, J.B. and Roger, B.L. 1989. The Role of Behavior in Insecticide Resistance. Pesric. Sci., 26, 383-399 '

Stenhouse, S.A., Plernsub, S., Yanola, J., Lumjuan, N., Dantrakool, A., Choochote, W. y Soombon, P. 2013. Detection of the V1016G mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by allele-specific PCR assay, and its distribution and effect on deltamethrin resistance in Thailand. Parasites & Vectors 6:253.

Stone BF, Haydock P. 1962. A method for measuring the acaricides susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). Bull Entomol Res 53:563-578.

Sutherst RW, Maywald GF, Kerr JD, Siegeman DA. 1983. The effect of the cattle tick *Boophilus microplus* on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. Aust J Agr Res; 34:317-27.

Suárez M, Méndez M, Valdez M, Moura R, Reis J, Vargas N, Ascanio E. 2007. Control de las infestaciones de la garrapata *Boophilus microplus* en la ganadería Cubana y en regiones de Latinoamérica con la aplicación del inmunógeno Gavac® dentro de

- un programa de lucha integral. Red Electrónica de Garrapatas y Enfermedades Transmitidas por Garrapatas para América Latina y el Caribe, RedEctopar. 58: 415-430.
- Sung, Y.Y., Yang, W.K., Kim, H.K. 2012. Antiplatelet, anticoagulant and fibrinolytic effects of *Litchi chinensis* Sonn. extract. Molecular Medicine Reports. 5; 721-724.
- Tan, J., Z. Liu, R Wang, Z. Y. Huang, A. C. Chen, M. Gurevitz and K. Dong. 2005. Identification of amino acid residues in the insect sodium channel critical for pyrethroid binding. *Mol. Pharmacol.* 67:513-522.
- Tan R., Zheng W., & Tang H., 1998. Biologically Active Substances from the Genus *Artemisia*, Review. *Planta Medica.* 64: 295-302
- Temeyer KB, Olafson PU, Brake DK, Tuckow AP, Li AY, Pérez de León AA. 2013. Acetylcholinesterase of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Phlebotomus papatasi*: gene identification, expression, and biochemical properties of recombinant proteins. *Pest Biochem Physiol* 106:118–123
- Temeyer KB, Davey RB, Chen AC. 2004. Identification of a third *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cDNA presumptively encoding an acetylcholinesterase. *J Med Entomol*, 41, 259-268.
- Treviño R. 2013. Evaluación de resistencia a ixodicidas y efectividad de la vacuna bm86 en el grado de infestación por garrapata *Boophilus* sp. en las razas de ganado bovino Charolais, Simmental, Brangus negro y comercial. Tesis UANL. p. 7-9.
- Vlahovic, M., Lazarevic, J., Peric-Mataruga, V., Ilijin, L., Mrdakovic, M., 2009. Plastic responses of larval mass and alkaline phosphatase to cadmium in the gypsy moth larvae. *Ecotoxicol. Environ Saf.* 72,1148–1155.
- Villarino MA, Waghela SD, Wagner GG. 2003. Biochemical detection of esterases in the adult female integument of organophosphate-resistant *Boophilus microplus* (Acari Ixodidae). *J Med Entomol.* 40, 52–57.
- Viveros-Valdez E., Jaramillo C., Oranday A., Morán J., Carranza P. 2016. Antioxidant, cytotoxic and alpha-glucosidase inhibition activities from the Mexican berry “Anacahuita” (*Cordia boissieri*). *Archivos latinoamericanos de nutrición.* 66(3) 211-218.

- Villar, C. Martínez, G. 1996. Niveles de infestación por la garrapata *Boophilus microplus* en la progenie de dos toros San Martinero suplementados con flor de azufre. Rev. Técnico-científica. p. 181–187.
- Villarreal JPV., dos Santos PR., Machado MAPdaS., Machado RHA., Gonçalves CL., Escareño JJH., dos Santos TRB., de Pereira CMP., Freitag RA., da Silva PN. 2017. Evaluation of phytotherapy alternatives for controlling *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in vitro. Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal, v. 26, n.03, p. 299-306.
- Viveros-Valdez E., Jaramillo C., Oranday A., Morán J., Carranza P. 2016. Antioxidant, cytotoxic and alpha-glucosidase inhibition activities from the Mexican berry “Anacahuita” (*Cordia boissieri*). Archivos latinoamericanos de nutrición. 66(3) 211-218.
- Wen, L., Wu, D., Jiang, Y., Prasad, K.N., Lin, S., Jiang, G., He, J., Zhao, M., Luo, W., Yang, B., 2014. Identification of flavonoids in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) leaf and evaluation of anticancer activities. Journal of Functional Foods. 6; 555-563.
- Wilce, M. C. J. and Parker, M. W. 1994. Structure and function of Glutathione S-Transferases. Biochem. Biophys. Acta, 1205, 1-18.
- Wei, S.H., Clark, A.G., Syvanen, M., 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyperinsecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. Insect Biochem. Mol. Biol. 31, 1145–1153.
- Willadsen, P. 1999. Immunological control of ectoparasites: past achievements and future research priorities. Genetic analysis: Biomolecular Engineering, 15: 131 – 137.
- Xu, X., Xie, H., Hao, J., Jiang, Y., Wei, X., 2011. Flavonoid glycosides from the seeds of *Litchi chinensis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59, 1205-1209.
- Yang, D., Chang, Y., Chen, Y., Liu, S., Hsu, C., Lin, J., 2012. Antioxidant effect and active components of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) flower. Food and Chemical Toxicology. 50; 3056-3061.
- Yamanishi, R., Yoshigai, E., Okuyama, T., Mori, M., Murase, H., Machida, T., Okumura, T., Nishizawa M., 2014. The Anti-inflammatory effects of flavanol-rich lychee fruit extract in rat hepatocytes. 9; 81-93.

- Zavala-Sánchez M., Pérez-Gutiérrez S., Pérez-González C., David Sánchez-Saldivar D., Arias-García L. 2002. Antidiarrhoeal Activity of Nonanal, an Aldehyde Isolated from *Artemisia ludoviciana*. Journal Pharmaceutical Biology. 40; 263-268.
- Zavala MA., Pérez GS., Pérez GC., Sánchez SD. y Arias GL. 2002. Antidiarrhoeal Activity of Nonanal, an Aldehyde Isolated from *Artemisia ludoviciana*. Pharmaceutical Biology, 40, 263-268.